

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biologie médicale
Département de physiologie

FACULTE DE MEDECINE

Professeur J. POSTERNAK

Directeur de thèse : Dr J. J. Dreifuss, professeur assistant

Neurosécrétion: Rôle du calcium et d'autres Ions

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Jean-Dominique GRAU

de

GENEVE

Thèse N° 12

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène

1974

Directeur de thèse : Dr J. J. Dreifuss, professeur assistant

Neurosecrétion: Rôle du calcium et d'autres Ions

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Jean-Dominique GRAU

de

GENEVE

Thèse N° 12

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Jean Posternak et du docteur J.J. Dreifuss, professeur assistant, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 10 octobre 1974

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 12



A MA FAMILLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545929_0023

TABLE DES MATIERES

	<u>page</u>
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION	3
- Généralités	3
- Mécanismes de sécrétion des hormones neurohypophysaires et influence de l'environnement ionique.	5
- Rôle du calcium dans le couplage stimulation-sécrétion.	7
- But du travail.	8
CHAPITRE 2	
METHODES	9
- Préparation des neurohypophyses.	9
- Dosages de l'ocytocine et de la neurophysine	9
a) Ocytocine	9
b) Neurophysine	10
- Techniques d'incubation	10
a) Technique générale	10
b) Expériences avec le lanthane	10
- Solutions	11
- Traitement statistique des résultats.	12
CHAPITRE 3	
RÉSULTATS	13
1) ACTION DU SODIUM SUR LA SECRETION HORMONALE CAUSEE PAR DEPOLARISATION POTASSIQUE	13
- Etude de la sécrétion des hormones neurohypophysaires en fonction du rapport Ca/Na du milieu d'incubation.	13
- Spécificité de l'action du sodium	17
a) Effet du lithium sur la sécrétion stimulée d'ocytocine <u>in vitro</u> .	17
- Substitution de quantités croissantes de lithium au sodium.	17
- Libération hormonale en fonction de la concentration externe de sodium ou de lithium.	17
b) Effet de la choline sur la libération d'ocytocine <u>in vitro</u> .	19
2) LA SUBSTITUTION DE STRONTIUM AU CALCIUM REQUIS POUR LE COUPLAGES STIMULATION-SECRE-TION.	19
a) Rétablissement par le strontium de la sécrétion hor-monale abolie par l'absence de calcium externe.	19
b) Libération d'ocytocine en fonction de la concentration de strontium.	21

- c) Effets du magnésium et du sodium sur la sécrétion stimulée en présence de strontium. 23
- d) Sommutation de l'action du calcium et du strontium. 23

3) EFFETS SUR LA SECRETION HORMONALE D'AGENTS QUI DIMINUENT LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE AU CALCIUM 25

- a) Tetrodotoxine 25
- b) Manganèse, cobalt 27
- c) D₆₀₀ 30

4) ACTION DU LANTHANE SUR LA SECRETION HORMONALE DE REPOS ET SUR LA SECRETION CAUSEE PAR DEPOLARISATION MEMBRANAIRE 32

- a) Effet sur la libération "spontanée" 32
- b) Influence du calcium sur la sécrétion produite par le lanthane 33
- c) Influence du sodium sur la sécrétion produite par le lanthane 35
- d) Influence du lanthane sur la sécrétion produite par l'élévation de la concentration potassique 36
- e) Lanthane et sécrétion par exocytose 38

CHAPITRE 4 DISCUSSION 40

RESUME 47

BIBLIOGRAPHIE 48

REMERCIEMENTS 55

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

GENERALITES

Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la neurohypophyse la font participer à la fois au système nerveux et au système endocrinien. Elle se compose, en plus de cellules gliales (les pituicytes) et d'un réseau capillaire important, des terminaisons axoniques de fibres nerveuses amyéliniques de faible diamètre; les corps cellulaires de ces éléments nerveux se situent au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et leurs axones cheminent le long de la tige pituitaire pour parvenir à la neurohypophyse.

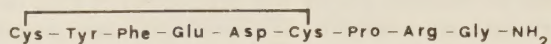
BARGMANN et SCHARRER (1951) ont postulé que ces cellules nerveuses étaient capables de déverser, dans le réseau capillaire abondamment distribué dans la neurohypophyse, des substances répondant à la définition d'une hormone, puisque elles sont véhiculées par le sang pour atteindre leurs organes-cible (utérus, glandes mammaires ou reins).

Depuis; des études histologiques ont montré que ces neurones renferment un grand nombre de granules, de quelque 2000 Å de diamètre, osmiphiles en microscopie électronique (BARGMANN, 1949; PALAY, 1957). Ces granules de neurosécrétion renferment environ 80 % du contenu hormonal total de la neurohypophyse associé à des protéines de transport, les neurophysines; le solde du contenu hormonal se trouve dans un compartiment extragranulaire (BARGMANN et SCHARRER, 1951; SAWYER, 1961; GINSBURG et IRELAND, 1966; DEAN et HOPE 1968). Les images en microscopie électronique font aussi apparaître des vésicules d'environ 500 Å de diamètre, dont le rôle n'est pas encore élucidé.

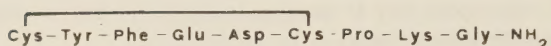
Il existe, chez les mammifères, deux hormones neurohypophysaires principales, l'ocytocine et la vasopressine (ou hormone antidiurétique). On doit surtout aux travaux de DU VIGNEAUD (1954) et de son laboratoire la détermination de la structure chimique de ces deux hormones; ce sont des polypeptides de poids moléculaire voisin de 1000 (fig. 1). Dernièrement, les structures primaire et secondaire des neurophysines de plusieurs espèces ont été publiées (WUU et coll., 1971; CAPRA et coll., 1972).

Deux approches distinctes ont guidé l'élucidation des diverses régulations de la sécrétion des hormones neurohypophysaires. Les premiers travaux ont visé à déterminer dans quelles situations, in vivo, chacune des deux hormones est libérée. En 1947, grâce à de remarquables expériences, VERNEY a pu préciser plusieurs points importants de la régulation de la sécrétion de l'hormone antidiurétique. Il a montré que l'un des facteurs conduisant à la libération, à partir de la neurohypophyse, de l'hormone antidiurétique est l'augmentation de la pression osmotique du sang. De plus, ses travaux ont permis de préciser que les osmorécepteurs impliqués dans cette régulation doivent se trouver au niveau de l'hypothalamus antérieur. La diminution de volume du compartiment sanguin est également un stimulus adéquat pour la libération de vasopressine (HELLER et GINSBURG, 1966).

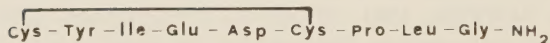
Pour l'ocytocine, divers stimuli conduisent également à sa libération dans le sang: la succion ou la stimulation mécanique du mamelon, la stimulation mécanique du vagin et du cervix de l'utérus (CROSS, 1961; BROOKS et coll., 1966; CHENG et FRIESEN, 1970).



ARGININE - VASOPRESSINE



LYSINE - VASOPRESSINE



OCYTOCINE

	OCYTOCINE	A - VASOPRESSINE
EJECTION DU LAIT (lapin)	100	1 6
ANTIDIURESE (rat)	0.3	100
PRESSIION SANGUINE (rat)	1.2	100

Figure 1. Structure primaire et activité biologique des hormones neurohypophysaires.

En haut les formules chimiques des principales hormones neurohypophysaires de mammifères; l'arginine - vasopressine est l'hormone antidiurétique la plus répandue, la lysine - vasopressine se retrouve essentiellement chez le porc. En bas, les activités relatives de l'ocytocine et de l'arginine - vasopressine neurohypophysaires sur quelques systèmes biologiques.

L'information sur les divers stimuli qui augmentent la sécrétion de chacune des deux hormones neurohypophysaires parvient par voies nerveuse ou humorale aux cellules des noyaux supraoptiques et paraventriculaires; des potentiels d'action y sont déclenchés qui, par propagation le long de la tige pituitaire, parviennent au site de libération hormonale, la neurohypophyse (fig. 2) (BROOKS et coll., 1966; DREIFUSS et coll., 1971a; DYBALL, 1971).

L'autre pôle de recherche a été de déterminer par quels mécanismes l'arrivée des potentiels d'action au niveau de la neurohypophyse, permet aux hormones contenues à l'intérieur des terminaisons d'être libérées dans la circulation sanguine. C'est avant tout aux travaux de DOUGLAS et POISNER (1964 b) que nous devons la majorité des connaissances accumulées depuis 10 ans sur les mécanismes de libération des hormones neurohypophysaires. La similitude de ces mécanismes avec, d'une part, ceux conduisant à la libération des catécholamines à partir de la médullo-surrénale dont DOUGLAS avait antérieurement entrepris l'étude avec RUBIN (1964) et, d'autre part, avec les mécanismes de libération d'acétylcholine aux terminaisons cholinergiques, amena DOUGLAS (1968) à émettre l'hypothèse d'un mécanisme commun de libération pour ces trois systèmes sécréteurs qui possèdent une origine commune, sur le plan embryologique. DOUGLAS, sur le modèle du concept de "couplage excitation-contraction" émis par SANDOW (1952) pour décrire les événements se déroulant lors du déclenchement de la contraction musculaire, énonça le concept de couplage stimulation-sécrétion, défini en ces termes: "stimulation-secretion coupling is intended to embrace all the events occurring in the cell exposed to its immediate stimulus that lead, finally, to the appearance of characteristic secretory product in the extracellular environment". Il est apparu par la suite que ce concept était également valable pour d'autres systèmes sécréteurs endocriniens, exocriniens et autres. Un des points le plus frappant est le rôle ubiquitaire joué par le calcium dans ce couplage stimulation-sécrétion qui soutient l'hypothèse que l'action du calcium en est un maillon essentiel. Deux autres similitudes marquantes entre ces divers systèmes sécréteurs sont à relever: l'influence de la composition ionique du milieu externe sur la sécrétion et également, le stockage des produits de sécrétion à l'intérieur de structures cytoplasmiques, délimitées par une membrane et dont la dimension varie entre 1 μm et 50 μm .

Mécanismes de sécrétion des hormones neurohypophysaires et influence de l'environnement ionique.

Le premier événement du couplage stimulation-sécrétion des hormones neurohypophysaires, est la dépolarisation des terminaisons axoniques de la neurohypophyse. In vivo, cette dépolarisation est produite par des potentiels d'action et la sécrétion peut être graduée par la modification de leur fréquence de décharge. In vitro, la dépolarisation de ces terminaisons nerveuses peut être obtenue soit par l'application d'un courant électrique au travers de la glande soit par l'augmentation de la concentration potassique externe. La dépolarisation des terminaisons axoniques de la neurohypophyse ne conduit à la libération hormonale que si le milieu externe renferme du calcium (DOUGLAS et POISNER, 1964a; MIKITEN et DOUGLAS 1965; ISHIDA, 1968). De plus la quantité hormonale libérée en réponse à un stimulus standard augmente progressivement avec l'élévation de la concentration de calcium externe pour atteindre un maximum à

4,4 mM de Ca; pour des concentrations calciques plus élevées (8,8 et 17,6 mM) une diminution de la libération hormonale est observée (DOUGLAS et POISNER, 1964a).

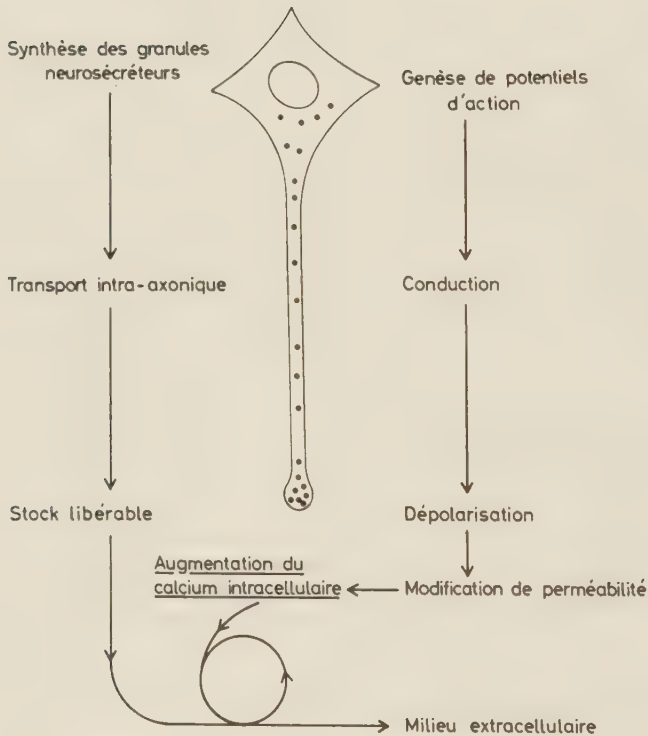


Figure 2. Représentation schématique d'une cellule neurosécrétrice.

Inscriptions de gauche: les hormones synthétisées au niveau des corps cellulaires sont stockées dans les granules neurosécréteurs qui, par flux axonique, sont transportés jusqu'à la neurohypophyse, site de libération de leur contenu hormonal.

Les inscriptions de droite décrivent schématiquement les événements qui, se déroulant à partir d'une information périphérique, conduisent à la libération hormonale in vivo par l'intermédiaire de potentiels d'action produits dans le corps cellulaires et propagés.

Le magnésium, vraisemblablement par compétition avec le calcium, inhibe la sécrétion hormonale alors que le potassium par son action dépolarisante la favorise. Le sodium, dont la présence dans le milieu extracellulaire est indispensable pour la production et la propagation des potentiels d'action, n'est pas requis pour la sécrétion des hormones neurohypophysaires; son omission dans le milieu externe n'empêche pas la réponse sécrétrice à la dépolarisation potassique, mais la potentialise.

Rôle du calcium dans le couplage stimulation-sécrétion.

Le rôle ubiquitaire et important joué par le calcium dans les divers systèmes sécréteurs, a suscité de nombreuses recherches; les unes ont eu pour but de préciser l'action possible du calcium au niveau subcellulaire, les autres ont été centrées sur les régulations et la cinétique des flux transmembranaires du calcium.

Plusieurs tissus se sont prêtés à ces dernières études, tels le muscle cardiaque (NIEDERGERKE, 1963; REUTER et SEITZ 1968) ou l'axone géant de calmar (BAKER, 1972). Il ressort de ces travaux que la concentration intracytoplasmique de calcium est de l'ordre de 0,4 mM; une très faible proportion de ce calcium est sous forme ionisée, le solde est soit complexé dans le cytoplasme ou concentré à l'intérieur des mitochondries. Le maintien de la faible concentration intracytoplasmique de calcium ionisé est assuré par deux facteurs principaux: le premier est l'extrusion du calcium vers l'espace extracellulaire par un échange $\text{Ca}_i\text{-Na}_e$ qui utilise l'énergie potentielle du gradient sodique, le second est la captation active du calcium par les mitochondries.

Lors de la stimulation des tissus nerveux ou musculaires, la perméabilité ionique de la membrane est augmentée, ce qui entraîne une augmentation de l'influx calcique. Cet influx calcique a pu, pharmacologiquement, être décomposé en deux phases:

- 1) une phase rapide, qui possède le même décours temporel que l'augmentation de la perméabilité sodique durant l'excitation et qui peut être abolie par la tétradotoxine, substance qui bloque sélectivement la conductance sodique; le calcium emprunte vraisemblablement, durant cette phase, les "canaux sodiques".
- 2) Une phase lente qui suit le même décours temporel que l'augmentation de la perméabilité potassique. Cependant le calcium n'y emprunte pas les "pores potassiques", leur blocage par l'injection intracellulaire de tétraéthylammonium, n'affecte pas l'influx de calcium durant cette phase. Par contre, elle peut être bloquée sélectivement par divers agents pharmacologiques:
 - a) certains ions divalents (cobalt, manganèse, magnésium)
 - b) certains ions trivalents, tels le lanthane
 - c) des substances organiques, telles le D_{600} et l'iproveratril

But du travail

La neurohypophyse isolée de rat incubée in vitro dans un milieu salin dont la composition ionique a pu être modifiée a servi à étudier les processus qui, après dépolarisation membranaire, aboutissent à la libération d'ocytocine dans l'espace extracellulaire.

Dans une première partie, (Chap. 3,1), nous avons étudié l'effet du sodium externe sur la sécrétion hormonale. Lorsque sa concentration dans le milieu d'incubation est réduite, la sécrétion d'ocytocine en réponse à une élévation standard de la concentration de potassium externe est accrue. Cette augmentation de la sécrétion neurohormonale pouvant s'expliquer par un antagonisme entre le sodium et le calcium dans le processus de sécrétion, nous avons étudié quantitativement cette interaction ionique en modifiant le rapport calcium/sodium du milieu d'incubation. Enfin, le problème de la spécificité du sodium a été abordé par l'étude de l'action sur la libération hormonale de la substitution de deux cations monovalents au sodium : le lithium et la choline.

Dans une deuxième partie de notre travail, (Chap. 3,2), nous montrons que l'action du calcium dans le couplage stimulation-sécrétion n'est pas absolument spécifique: l'adjonction de strontium à des solutions salines dépourvues de calcium est capable de promouvoir la sécrétion d'ocytocine. Des expériences où l'action du calcium et du strontium ont été comparées indiquent que ces deux cations aux propriétés physico-chimiques voisines, possèdent une action semblable sur les processus qui aboutissent à la libération des hormones neurohypophysaires.

Sachant que le calcium joue un rôle essentiel dans les processus qui relient la dépolarisation membranaire à la neurosécrétion, il convenait de s'interroger si des substances qui réduisent la perméabilité calcique des membranes dans d'autres tissus excitables interfèrent avec la sécrétion d'ocytocine causée par la dépolarisation. Le fait qu'il en est ainsi - montré dans la troisième partie du travail, (Chap. 3,3) - indique qu'au cours de la dépolarisation membranaire, le calcium doit pénétrer dans les terminaisons neurosécrétrices pour activer l'expulsion d'ocytocine. De plus, (Chap. 3,4), nous avons utilisé une approche pharmacologique pour déterminer la nature de la variation de perméabilité membranaire qui permet au calcium de diffuser dans le milieu intra-cellulaire. Parmi les substances qui réduisent la perméabilité membranaire au calcium, le lanthane a plus particulièrement retenu notre attention; en effet, il ne bloque pas seulement la sécrétion d'ocytocine en réponse à une dépolarisation, mais il augmente significativement sa libération de base par un mécanisme qui est indépendant de la concentration externe de calcium, mais qui semble s'effectuer par le même mécanisme de vidange des granules neurosécréteurs.

CHAPITRE 2

METHODES

Préparation des neurohypophyses

Les neurohypophyses ont été prélevées sur des rats de souche Carworth, de 200 - 300 grammes obtenus auprès de l'Institut Vétérinaire de Zürich. Après décapitation de l'animal, la peau et les os craniens sont incisés longitudinalement et écartés, permettant l'accès au cerveau. Celui-ci est récliné précautionneusement d'arrière en avant, sous loupe binoculaire de manière à rendre visible l'hypophyse. La tige pituitaire qui relie l'hypophyse au cerveau est sectionnée et le cerveau est alors totalement récliné. La dure-mère qui enveloppe l'hypophyse est éliminée et la neurohypophyse, munie d'un segment de tige pituitaire, est facilement séparée de l'adénohypophyse et placée dans un bac rempli de solution physiologique pour la fin de la dissection. La neurohypophyse ainsi préparée est incisée longitudinalement puis attachée à un support de platine par le segment de tige pituitaire restant à l'aide d'un fil de soie. Puis la préparation est incubée pendant 20 minutes dans 1 ml de solution de LOCKE maintenue à 37° et dans lequel barbotte un mélange gazeux de 95 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. Le pH de cette solution est maintenu à $7,4 \pm 0,2$. Cette première incubation doit permettre au tissu lésé par la dissection de se "cicatriser". Après quoi la glande est prête à subir les diverses manipulations expérimentales.

Dosages de l'ocytocine et de la neurophysine.

a) Ocytocine. La détermination des quantités d'ocytocine libérées dans le milieu d'incubation par les neurohypophyses est effectuée à l'aide d'un test biologique (BISSET et coll., 1967) basé sur une des propriétés physiologiques de l'ocytocine: chez la rate allaitante, la succion des mamelons par les petits déclenche une libération réflexe d'ocytocine neurohypophysaire. Cette hormone, véhiculée par le sang jusqu'aux glandes mammaires, y facilite l'éjection du lait par contraction des cellules myoépithéliales; l'injection d'ocytocine exogène aboutit à la même situation. L'augmentation de la pression intramammaire, dans un domaine de concentrations limité, est proportionnelle à la dose hormonale injectée.

Des rates sont séparées de leurs petits 5 à 10 jours après la mise-bas et anesthésiées à l'uréthane (BDH Chemicals Ltd, Angleterre) par injection intrapéritonéale de 100 mg / 100 g de poids corporel. Après canulation de la trachée, un fin tube de polyéthylène (PP 10, Portex Angleterre) est introduit dans une des veines jugulaires pour l'administration des solutions à doser et des solutions standard d'ocytocine (Syntocinon, Sandoz Bâle). L'enregistrement des variations de pression intramammaires consécutives à l'injection des solutions (inconnues ou standard) se fait à l'aide d'un coupleur mécano-électrique (Statham P23) connecté à un enregistreur sur papier (Devices M2) et relié à l'une des glandes mammaires par une canule de polyéthylène (PP 10) remplie de citrate de sodium 2 %. Le seuil de la réponse est généralement atteint par l'injection de quantités d'ocytocine comprises entre 50 et 100 nU internationales; une contraction maximale de la glande mammaire est obtenue

avec des doses de 500 à 1000 nU. Le dosage se fait par la comparaison de la réponse obtenue par l'injection d'un volume compris entre 0,50 et 0,2 ml de la solution inconnue (ou d'une dilution de celle-ci lorsque sa teneur en hormone est trop élevée) avec la réponse obtenue par l'injection de doses graduées de la solution standard.

Ce test n'est pas entièrement spécifique parce que la vasopressine possède une faible action sur le tissu mammaire (CROSS et VAN DYKE, 1953).

Chaque fois que la solution inconnue a subi des modifications importantes de sa composition ou renferme des substances pouvant interférer avec la réponse de la glande mammaire à l'ocytocine, nous avons examiné si elle avait un effet propre sur la contraction de la glande mammaire ou si elle pouvait modifier la réponse de la glande à des injections de doses-standard.

- b) Neurophysine. Les dosages de la neurophysine contenue dans les milieux d'incubation ont été effectués par le Dr. J. J. LEGROS (Liège, Belgique) par détermination radioimmunologique (LEGROS et coll., 1969). La neurophysine standard est de la neurophysine II de boeuf.

Techniques d'incubation

- a) Technique générale. Pour les études de l'effet, sur la libération d'ocytocine provoquée par l'élévation de la concentration externe de potassium, du rapport $(Ca)_e / (Na)_e^2$, de la substitution du lithium au sodium, de la substitution du strontium au calcium, de l'adjonction au milieu d'incubation de substances bloquant la perméabilité calcique de la membrane (Tetrodotoxine, Mn, Co, D₆₀₀), nous avons choisi le mode d'incubation suivant :

Après la dissection, chaque neurohypophyse est placée pendant une période de 20 minutes dans la solution de "LOCKE normale" (dont la composition sera décrite plus loin). Puis, pendant une deuxième période de 20 minutes, la neurohypophyse est immergée dans un milieu ayant subi, selon l'étude poursuivie, des modifications ioniques ou l'adjonction d'agents pharmacologiques. Le passage de l'hypophyse dans ce milieu intermédiaire est destiné à équilibrer le milieu interstitiel avec le milieu d'incubation. Après quoi, pendant une ultime période d'incubation de 10 minutes, nous avons stimulé la préparation par l'élévation de la concentration potassique du milieu d'incubation de 5,6 mM à 56,0 mM. Cette dernière incubation se fait dans un milieu dont la composition est identique à celle de la deuxième période à l'exception de l'élévation de la concentration potassique. Les solutions ayant servi à cette dernière incubation sont conservées à 4° C, jusqu'à ce que leur contenu en ocytocine soit dosé.

- b) Pour les études de l'effet du lanthane sur la sécrétion hormonale, nous avons procédé à des expériences de longue durée, car l'effet du lanthane se développe lentement. Après deux périodes d'incubation initiales semblables à celles décrites ci-dessus, l'effet du lanthane a été suivi pendant plusieurs périodes d'incubation de 20 minutes chacune.

Solutions

Les solutions employées dans ce travail dérivent de la solution physiologique de LOCKE (1894); la solution qui est désignée par "LOCKE normale" se compose de: 150 mM de NaCl, 2,2 mM de CaCl_2 , 5,6 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 10 mM de glucose et est tamponnée par 6 mM de NaHCO_3 . (Le CO_2 étant fourni par le gazage). Nous indiquerons dans le texte les modifications apportées à la composition de cette solution. Lors de la suppression ou de la diminution de la concentration d'un de ses constituants, l'osmolarité de la solution a été maintenue à 350 mosmoles par l'adjonction de chlorure de choline.

Nous appelons dans le texte "milieu normal" ou "milieu non stimulant" une solution dont la concentration potassique est de 5,6 mM, quelque soit la composition de ses autres constituants, et "milieux stimulants" ou "dépolarisants" les solutions où la concentration potassique est de 56 mM. A cause de la faible solubilité du carbonate de calcium, qui précipite lentement, les solutions ont été préparées extemporanément.

Dans les expériences sur l'étude de l'effet du lanthane sur la secretion normale, le tampon acide carbonique / bicarbonate a été remplacé par le tampon TRIS (Tris-(hydroxyméthyle)-aminométhane), le carbonate de lanthane étant insoluble. Dans ce cas le gazage des solutions se fait avec de l'oxygène pur.

Les produits courants pour la préparation des solutions ont été obtenus chez MERCK AG Darmstadt; les autres chez:

- FLUKA, Buchs (LiCl_2 , LaCl_3 , CoCl_2 et TRIS)
- BDH Chemicals Ltd, Angleterre (SrCl_2)
- KNOLL, Ludwigshafen am Rhein (D600)
- SANKYO, Japon (Tétrodotoxine)
- SANDOZ, Bâle (Syntocinon^R).

Traitement statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne ($\bar{x}$) $\pm$ 1 écart standard de la moyenne (S. E.) où

$$S. E. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1) n}}$$

n = nombre d'expériences

x_i = valeurs individuelles

$\bar{x}$ = moyenne arithmétique

Pour déterminer si deux groupes de résultats sont significativement différents, nous avons employé le test de Student, dont le paramètre, t , est calculé selon la formule

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{SS_1 + SS_2}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ = moyennes

n_1, n_2 = nombre d'expériences

SS_1, SS_2 = somme des écarts au carré = $\sum (x_i - \bar{x})^2$

CHAPITRE 3

RESULTATS

1) ACTION DU SODIUM SUR LA SECRETION HORMONALE CAUSEE PAR DE-POLARISATION POTASSIQUE

Etude de la sécrétion des hormones neurohypophysaires, en fonction du rapport (Ca)/(Na) du milieu d'incubation

Nous rapportons dans ce chapitre les résultats d'expériences sur l'effet de la variation de la concentration sodique sur la libération d'ocytocine in vitro causée par l'élévation de la concentration potassique externe.

Une série de neurohypophyses ont été soumises à 3 stimulations potassiques de 10 minutes chacune, en présence de sodium à 3 concentrations différentes (150, 100 et 50 mM), présentées dans un ordre aléatoire. Entre les différentes stimulations, chaque glande était incubée pendant 20 minutes dans un milieu non stimulant (5,6 mM de KCl), où la concentration sodique était identique à celle de la période de stimulation suivante. Les quantités d'ocytocine libérées au cours de deux expériences-types de ce genre sont représentées sur la figure 3. Il apparaît que la libération d'ocytocine a été plus élevée en présence de 50 mM de NaCl qu'en présence de 100 mM, elle-même plus élevée que celle obtenue avec 150 mM de sodium. Cette gradation de la réponse en fonction de la concentration sodique était indépendante de l'ordre dans lequel la concentration de Na est modifiée. L'effet freinateur du sodium, observé au cours de cette expérience, ne peut pas être imputé aux changements de la concentration du chlorure de choline (employé pour maintenir la pression osmotique du milieu d'incubation, lors des abaissements de la concentration sodique). Des expériences-témoin ont montré en effet que le chlorure de choline ne possédait pas d'effet en soi sur la sécrétion hormonale provoquée par dépolarisation potassique. (GRAU 1972).

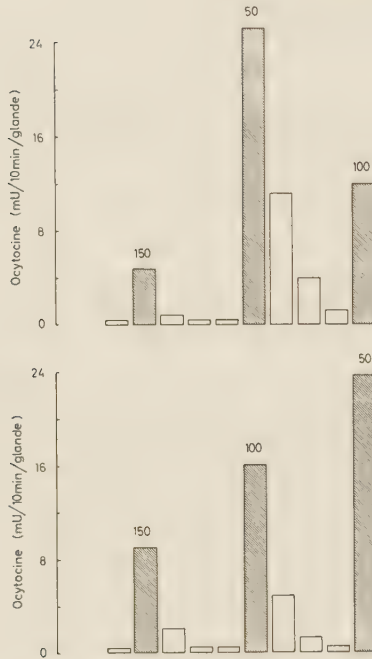


Figure 3. Effet de la substitution partielle au sodium externe de choline sur la sécrétion de l'ocytocine par la neurohypophyse isolée in vitro.

Nous représentons sur cette figure les résultats de deux expériences où l'influence de la concentration sodique externe sur la sécrétion d'ocytocine causée par dépolarisation potassique a été étudiée.

Chaque neurohypophyse a été incubée pendant 10 périodes successives de 10 minutes chacune, les colonnes représentent la quantité d'ocytocine libérée (en mU/10 min./glande):

Les colonnes hachurées représentent les périodes d'incubation pendant lesquelles la neurohypophyse a été soumise à une stimulation par élévation de la concentration potassique externe (56 mM), en présence de sodium à 3 concentrations différentes (les concentrations sodiques, en mM, sont inscrites au dessus de ces colonnes).

Il a pu être démontré, dans les études sur la force de contraction du muscle cardiaque et dans certaines études sur la libération des médiateurs chimiques, qu'il existe une relation linéaire entre la force de contraction du muscle cardiaque ou la sécrétion de médiateur chimique et le rapport $(Ca)^2 / (Na)^2$ externe.

Partant de cette relation, nous avons étudié l'interaction calcium-sodium sur la libération d'ocytocine causée in vitro par l'augmentation de la concentration externe de potassium. 56 neurohypophyses ont été incubées isolément, selon la technique décrite dans "Méthodes" en présence de différentes combinaisons de concentrations sodiques et calciques. Ces dernières ont été calculées de manière à obtenir 4 rapports $(Ca) / (Na)^2$ différents et pour chaque valeur de ces 4 rapports, 2 ou 3 combinaisons calcium-sodium différentes. Ces combinaisons sont reportées sur le tableau I.

TABLEAU I : Concentrations calciques et sodiques et valeur du rapport $(Ca) / (Na)^2$

Ca(mM)	Na(mM)	$Ca / Na^2(M^{-1})$	nbr. d'exp.
1,24	150	0,55	5
0,55	100		5
2,475	150	0,11	5
1,1	100		5
0,275	50		6
5,0	150	0,22	5
2,2	100		5
0,55	50		4
9,9	150	0,44	5
4,4	100		6
1,1	50		5

Nous avons dosé les quantités d'ocytocine libérées lors de la dépolarisation potassique (56 mM de KCl) dans ces différents milieux et les résultats sont représentés sur la figure 4.

Ces résultats indiquent:

a) Pour autant que le rapport $(Ca) / (Na)^2$ soit constant, la libération hormonale en réponse à la stimulation potassique restait constante; l'analyse de variance simple (effectuée avec le concours du Prof. P. VUAGNAT) montre l'homogénéité des résultats obtenus pour chacune des valeurs du rapport $(Ca) / (Na)^2$, à l'exception des résultats obtenus lorsque le calcium est à concentration élevée (5 et 9,9 mM).

b) La libération d'ocytocine était fonction linéaire (dans le domaine de concentrations étudié) de la valeur du rapport $(Ca) / (Na)^2$.

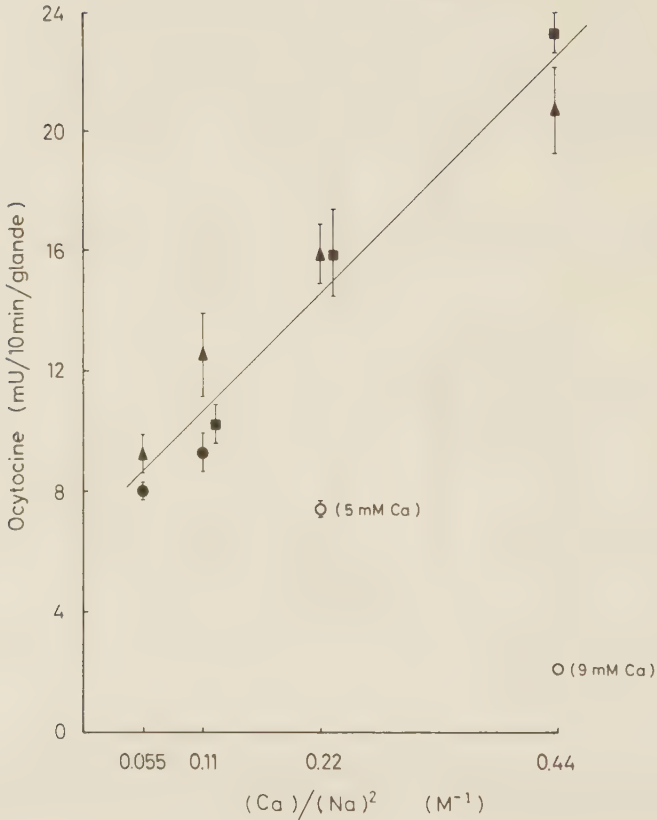


Figure 4. Libération hormonale causée par une dépolarisation potassique standard (56 mM) en fonction du rapport Ca/Na^2 .

En ordonnées, les quantités d'ocytocine (mU/10 min/glande) libérées lors de stimulations potassiques de 10 minutes en présence de différentes combinaisons des concentrations de calcium et de sodium, dont les valeurs, exprimées par le rapport Ca/Na^2 , figurent en abscisses (M^{-1}).

Chaque point représente la moyenne d'au moins 4 expériences ± 1 écart standard. Nous avons distingué sur ce graphique les résultats obtenus en présence des trois concentrations sodiques employées :

50 (■), 100 (▲) et 150 (●) mM de Na. Les concentrations calciques utilisées peuvent être retrouvées dans le texte (tableau I). Les deux valeurs représentées par des cercles vides (○) sont celles obtenues en présence de 5 et 9,9 mM de calcium; elles sont significativement inférieures à celles attendues.

Spécificité de l'action du sodium.

Les études de l'antagonisme calcium-sodium au niveau de la fibre cardiaque (LÜTTGAU et NIEDERGERKE, 1958) et de la jonction neuro-musculaire (GAGE et QUASTEL, 1966) montrent que le sodium possède une action spécifique qui ne peut être reproduite ni par le lithium, ni par la choline. Toutefois, KELLY (1968) observe que la substitution au sodium de divers cations monovalents, tels le lithium, le méthylammonium ou l'éthylammonium, ne modifie pas de manière notable la libération d'acétylcholine des terminaisons nerveuses motrices, en réponse à la dépolarisation potassique. Par contre, la sécrétion est fortement accrue lors de la substitution au sodium de saccharose ou de glycine. Ces résultats ont été interprétés comme indiquant une spécificité vis-à-vis du processus sécréteur des cations monovalents et non du seul sodium.

La question restant donc ouverte pour la jonction neuro-musculaire, nous avons étudié l'effet de deux ions monovalents, le lithium et la choline, sur la sécrétion d'ocytocine in vitro.

a) Effet du lithium sur la sécrétion stimulée d'ocytocine in vitro.

L'effet du lithium comme substituant possible du sodium a été étudié par deux approches:

- Substitution de quantités croissantes de sodium par le lithium.
- Comparaison de la libération d'ocytocine provoquée par le potassium en fonction, d'une part, de la concentration sodique et d'autre part, de la concentration du lithium.

Substitution de quantités croissantes de lithium au sodium.

Nous avons, selon la technique d'expérience habituelle, comparé les quantités d'ocytocine libérées lors de la stimulation potassique en présence de 150 mM de Na (expérience-témoin) avec les quantités d'ocytocine libérées lorsque 50 ou 100 mM de lithium sont substituées à 50 ou 100 mM de sodium. Nous avons, pour chacun de ces cas, effectué 5 expériences. Les résultats devraient être identiques si le lithium possédait les mêmes propriétés et la même efficacité que le sodium. Or, les résultats de ces expériences n'ont pas entièrement confirmé cette hypothèse. La libération d'ocytocine a passé, en effet, de 6 mU / 10 min / glande dans l'expérience-témoin, à 7 mU / 10 min / glande lors de la substitution de 50 mM de Li par 50 mM de Na, et à 11,4 mU / 10 min / glande lors de la substitution de 100 mM de Li par 100 mM de Na.

Ces résultats ne permettent toutefois pas d'affirmer que l'effet du sodium est spécifique car il se peut que le lithium agisse de manière identique au sodium mais avec une efficacité moindre.

Libération hormonale en fonction de la concentration externe de sodium ou de lithium.

Pour élucider ce point, nous avons effectué une expérience complémentaire où nous avons estimé la libération d'ocytocine sous stimulation potassique en fonction, d'une part, de la concentration du sodium (150, 100 et 50 mM) et d'autre part, de la concentration du lithium (150, 100 et 50 mM, le sodium étant omis).

Ainsi que nous l'avons montré, la libération hormonale est fonction inverse de la concentration sodique du milieu d'incubation. De même, la sécrétion hormonale dépend inversement de la concentration de lithium; cependant le lithium possède une efficacité inhibitrice moindre puisque, pour chacune des concentrations étudiées, la libération en présence de lithium est 63 % plus élevée en moyenne que la libération en présence de sodium (fig. 5).

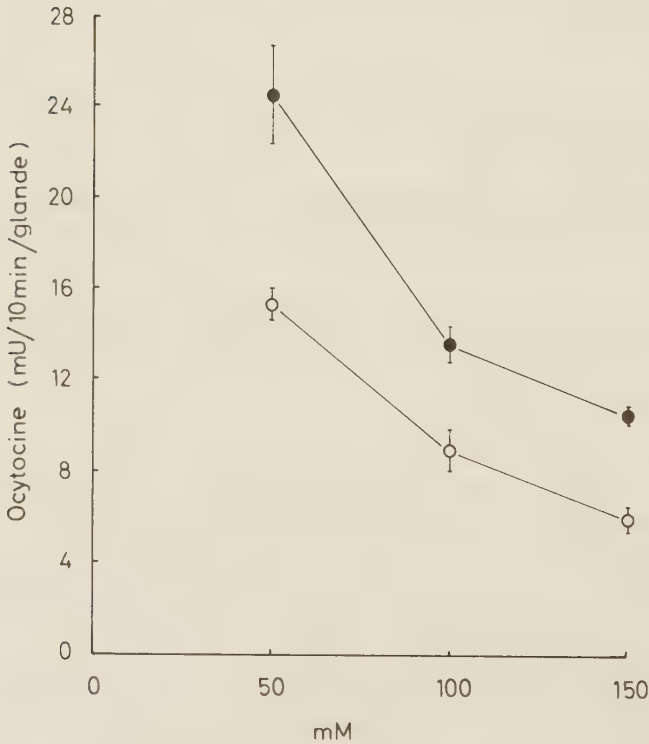


Figure 5. Libération d'ocytocine lors de la dépolarisation potassique en fonction de la concentration externe de sodium ou de lithium.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine libérée au cours d'une période de 10 min d'incubation dans un milieu stimulant (56 mM de KCl) en présence de sodium (O) ou de lithium (●) aux concentrations indiquées en abscisses.

En présence de 50 mM de lithium ou de sodium, la tonicité du milieu a été maintenue par l'adjonction de 50 mM de choline.

b) Effet de la choline sur la libération d'ocytocine in vitro.

Nous avons, dans un travail précédent, étudié la possibilité de maintenir l'osmolarité du milieu d'incubation, lors de l'abaissement de la concentration sodique, par le chlorure de choline (GRAU, 1972).

Les résultats, regroupés dans le tableau II, montrent que la variation de la concentration de chlorure de choline de 50 à 100 mM dans un milieu renfermant 50 mM de Na, ainsi que de 0 à 50 mM dans un milieu renfermant 100 mM de Na, ne modifie par la réponse hormonale à la stimulation potassique.

Ainsi la choline, contrairement au sodium et au lithium, ne possède pas d'action freinatrice sur la libération hormonale:

TABLEAU II: Effet de la choline sur la sécrétion d'ocytocine en réponse à une dépolarisation

Concentration (mM)	Nombre d'exp.	Ocytocine (mU/10 min)	S. E.
Na 50/Ch 100	5	15,8	1,6
Na 50/Ch 50	5	15,4	0,7
Na 100/Ch 50	5	10,4	1,4
Na 100/Ch 0	5	10,2	0,7

Ch = chlorure de choline

Na = chlorure de sodium

non significatif ($0,8 < p < 0,9$)

non significatif ($0,8 < p < 0,9$)

En résumé la spécificité de l'action du sodium dans le processus de libération des hormones neurohypophysaire est donc relative et peut être reproduite par les cations monovalents de faible diamètre.

2) SUBSTITUTION DE STRONTIUM AU CALCIUM REQUIS POUR LE COUPLAGE STIMULATION-SECRETION

Nous avons effectué une série d'expériences pour examiner si le strontium pouvait se substituer au calcium dans le processus qui aboutit à la sécrétion des hormones neurohypophysaires.

a) Rétablissement par le strontium de la sécrétion hormonale abolie par l'absence de calcium externe

Dans un milieu où le calcium a été omis, une élévation de la concentration externe de KCl ne produit pas d'accroissement de la sécrétion hormonale; l'adjonction de calcium le rétablit pour autant que l'absence de calcium n'excède pas une durée critique (DOUGLAS et POISNER, 1964a). Nous avons testé si le strontium était capable d'activer la sécrétion d'ocytocine en réponse à une dépolarisation effectuée en milieu privé de calcium.

Six neurohypophyses ont été incubées isolément *in vitro*, en présence de NaCl, à la concentration de 50 mM pendant 3 périodes de 10 minutes dans un milieu

non stimulant où le calcium était omis; puis après stimulation potassique de 10 minutes en absence de calcium, nous avons poursuivi la stimulation pendant 10 minutes, pour trois glandes en présence de calcium (2,2 mM), pour les trois autres en présence de strontium (10 mM). Les résultats sont reportés sur la figure 6, qui montre que la stimulation potassique en absence de calcium ou de strontium a été incapable d'accroître la libération hormonale. L'adjonction de calcium, ou l'adjonction de strontium, a rétabli l'action stimulatrice de la dépolarisation potassique sur la sécrétion d'ocytocine.

Le strontium possédait donc dans ces conditions expérimentales une action similaire à celle du calcium.



Figure 6. Rétablissement par le strontium ou par le calcium de la sécrétion hormonale abolie par l'absence de calcium externe.

Chaque colonne représente la quantité d'ocytocine libérée par période de 10 minutes d'incubation (moyenne de 3 expériences $\pm$ 1 écart standard) en mU/10 min/glande, au cours de 3 incubations successives. Les colonnes blanches indiquent que la concentration potassique du milieu d'incubation est normale (5,6 mM) et les colonnes hachurées représentent les périodes d'incubation où la concentration potassique a été élevée à 56 mM.

En haut, le rétablissement de la sécrétion hormonale, abolie par l'omission du calcium, a été obtenu par l'adjonction de 2,2 mM de Ca au milieu d'incubation.

En bas, il a été obtenu par l'adjonction de 10 mM de strontium.

b) Libération d'ocytocine en fonction de la concentration de strontium

En vue d'établir la relation qui existe entre la concentration externe de strontium et les quantités d'ocytocine libérées en réponse à une dépolarisation potassique standard (56 mM) des neurohypophyses isolées ont été incubées in vitro, en présence de SrCl_2 aux concentrations suivantes: 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 12 et 25 mM. Les incubations se sont déroulées selon la technique générale dans un milieu contenant 50 mM de NaCl et dépourvu de CaCl_2 . Pour chaque concentration de strontium étudiée, nous avons effectué au minimum 4 expériences. La figure 7 résume les résultats obtenus. En présence de 0,25 mM de Sr la libération a été du même ordre de grandeur que la libération "spontanée"; le contenu hormonal des incubats s'est accru régulièrement en fonction de la concentration de Sr jusqu'à 8 mM, où il a atteint un maximum; pour des concentrations plus élevées de Sr (12 et 25 mM) la sécrétion a été moins élevée. (BUCHS et coll., 1972).

La comparaison des quantités d'ocytocine libérées par stimulation potassique en présence de calcium à celles obtenues en présence de strontium semble indiquer une moindre efficacité du strontium par rapport à celle du calcium dans le processus de sécrétion hormonale. Les résultats, qui ont fait l'objet de ces comparaisons, sont rassemblés dans le tableau III. (Les résultats pour le calcium sont tirés de la figure 4).

TABLEAU III: Comparaison des quantités d'ocytocine libérées par stimulation potassique en présence de calcium et en présence de strontium.

Ca (mM)	lib. hormonale			Sr (mM)	lib. hormonale		
	(mU/10 min/gl.)				(mU/10 min/gl.)		
	Moyenne		SE		Moyenne		SE
0,55	15,9	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	0,5	0,50	5,5	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	1,0
1.1	23,2	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	0,7	1,0	12,5	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	1,5

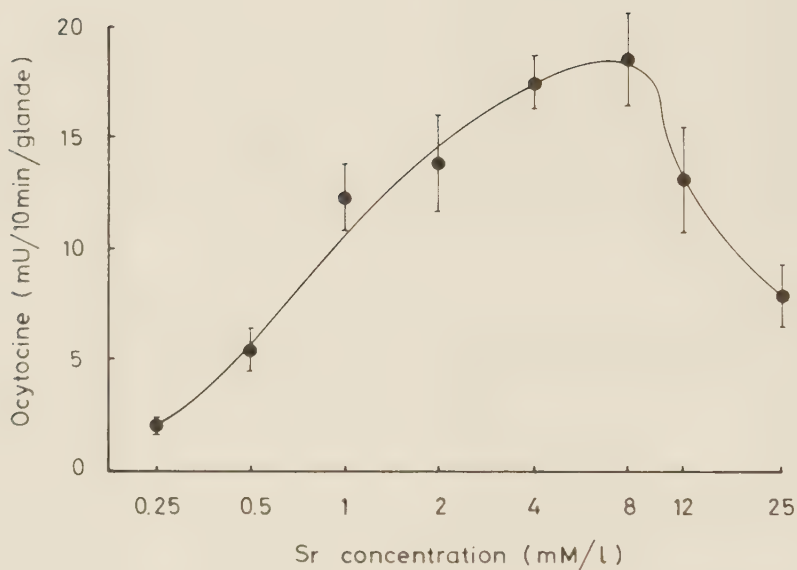


Figure 7. Relation entre la sécrétion hormonale causée par dépolarisation potassique et la concentration de strontium externe.

La libération d'ocytocine obtenue en réponse à une dépolarisation potassique standard (56 mM) dans une solution de Locke dépourvue de calcium est portée en fonction de la concentration de strontium du milieu d'incubation (Abcisses, mM).

Chaque point représente la moyenne, ± 1 écart standard, de 4 expériences (sauf pour 4 mM de Sr où $n=7$).

c) Effets du magnésium et du sodium sur la sécrétion stimulée en présence de strontium.

Trois groupes de 4 neurohypophyses ont été incubés selon le schéma expérimental habituel. Dans le premier groupe, les glandes ont été incubées dans un milieu, dépourvu de calcium, contenant 6 mM de Na et stimulées en présence de Sr à la concentration de 5 mM. Dans le deuxième groupe, les neurohypophyses ont été incubées dans un milieu similaire, à la différence près que la concentration de $MgCl_2$ a été portée de 1 à 10 mM. Dans le troisième groupe, nous avons étudié l'effet du Na sur la sécrétion stimulée d'ocytocine en présence de strontium en augmentant la concentration sodique de 6 à 150 mM (la concentration de $MgCl_2$ étant de 1 mM).

Les résultats obtenus (Fig. 8) ont montré que les ions Mg et Na inhibaient la sécrétion des hormones neurohypophysaires causée par dépolarisation potassique, en présence de strontium. Les quantités d'ocytocine sécrétées ont passé de $30,8 \pm 1,9$ à $13,9 \pm 2,3$ MU/10 min/glande, lorsque la concentration de Mg était élevée de 1 à 10 mM, et de $30,8 \pm 1,9$ à $2,7 \pm 0,5$ mU/10 min/glande, lorsque la concentration sodique passait de 6 à 150 mM.

d) Sommation de l'action du calcium et du strontium

Nous avons étudié l'effet, sur la sécrétion hormonale stimulée par dépolarisation potassique, de l'adjonction de 4 mM de Sr en présence de deux concentrations de Ca (0,5 et 4,0 mM). Les incubations se sont déroulées selon le schéma usuel, en présence de 50 mM de NaCl, et les résultats sont regroupés dans le tableau IV.

TABLEAU IV: Sommation de l'action du strontium et du calcium.

Ca (mM)	Sr (mM)	Lib. ocytocine (mU/10 min/gl.		Nbr. d'exp.
		moyenne	SE	
0,5	0,0	6,3	$\pm$ 1,3	4
0,5	4,0	8,9	$\pm$ 0,3	4
4,0	0,0	14,8	$\pm$ 0,8	4
4,0	4,0	10,4	$\pm$ 1,5	4

Nous constatons que l'adjonction de 4 mM de Sr en présence de 0,5 mM de Ca tend à augmenter la libération d'ocytocine, tandis qu'en présence de 4 mM de Ca, l'adjonction de 4 mM de Sr la diminue.

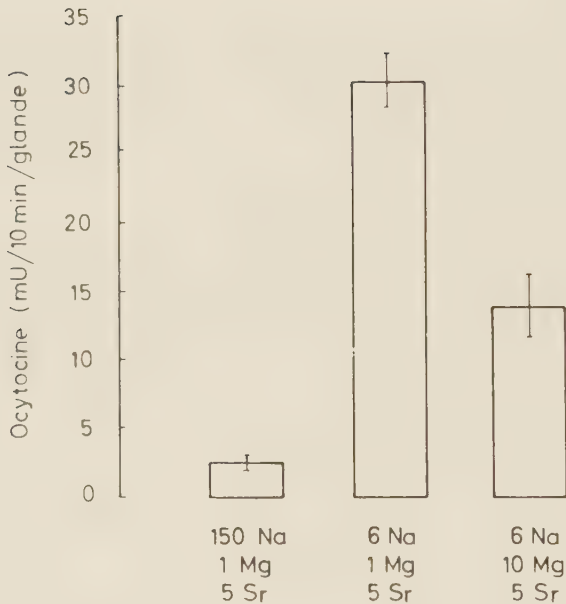


Figure 8. Effet du sodium et du magnésium sur la sécrétion causée par l'augmentation de la concentration de potassium (56 mM) en présence de strontium.

En ordonnées, la quantité d'ocytocine libérée lors de la stimulation potassique, en mU/10 min/glande. Chaque colonne représente la moyenne de 4 expériences ± 1 écart standard.

Colonne du centre: expérience témoin; les neurohypophyses ont été stimulées en présence de 6 mM de Na, 1 mM de Mg et 5 mM de Sr.

Colonne de gauche: la concentration sodique a été élevée à 150 mM; la libération obtenue dans cette expérience, en comparaison de celle obtenue dans l'expérience témoin, a révélé un effet freinateur du sodium sur la sécrétion stimulée en présence de strontium.

Colonne de droite: L'augmentation de la concentration de Mg (de 1 à 10 mM) a produit également une inhibition de la libération hormonale stimulée en présence de strontium.

3) EFFETS SUR LA SECRETION HORMONALE D'AGENTS QUI DIMINUENT LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE AU CALCIUM.

Des études entreprises à l'aide de ^{45}Ca ont permis de démontrer que la dépolarisation des terminaisons neurosécrétrices de la neurohypophyse s'accompagne d'une entrée accrue de calcium dans le compartiment intracellulaire. DOUGLAS et POISNER (1964b) ont montré qu'il existe un parallélisme entre, d'une part, la captation de ^{45}Ca et d'autre part, les quantités d'hormones qui apparaissent dans le milieu d'incubation. Ainsi, par exemple, l'adjonction de magnésium (10-20 mM) à la solution d'incubation produit une réduction de l'entrée de Ca et une diminution de la libération hormonale produite par dépolarisation. L'abaissement de la concentration externe de Na, qui potentialise la sécrétion causée par une élévation de la concentration de KCl, augmente de façon significative la captation de ^{45}Ca (NORDMANN, 1973).

Nous avons entrepris une série d'expériences où nous avons estimé la sécrétion hormonale de la neurohypophyse en présence de substances qui réduisent la perméabilité au calcium de membranes excitables: la tétródotoxine, le cobalt, le manganèse et le D 600.

a) Tétródotoxine

Cette substance interfère sélectivement avec l'augmentation de la perméabilité sodique de la membrane de l'axone géant de langouste (NARAHASHI et coll., 1964), ainsi que d'autres membranes excitables (KAO, 1966).

Nous avons incubé des neurohypophyses dans un milieu contenant 100 mM de NaCl; après une incubation de 20 minutes, elles ont été stimulées pendant 10 minutes par élévation de la concentration de potassium externe (56 mM) en l'absence ($n = 4$) ou en présence ($n = 4$) de 10^{-7} g/ml de tétródotoxine.

Dans ces conditions expérimentales, la tétródotoxine ne possédait aucun effet mesurable sur la sécrétion hormonale (test de Student: $p > 0,8$), (Fig. 9).

ISHIDA (1967) avait montré que la diminution du sodium externe potentialise l'effet de la tétródotoxine sur la sécrétion hormonale. Nous avons donc effectué les mêmes expériences, mais dans un milieu ne contenant que 6 mM de Na, avec deux lots de 9 glandes chacun. A nouveau, la libération hormonale en présence de tétródotoxine ne différait pas significativement de celle obtenue en son absence (test de Student: $p > 0,2$), (Fig. 9)

Nous nous sommes mis dans une condition expérimentale encore plus favorable pour déceler un effet de la tétródotoxine sur la sécrétion hormonale; ceci en abaissant la concentration sodique et, de plus, en bloquant partiellement, par l'adjonction de 1 mM de CoCl_2 , l'entrée de calcium qui a lieu pendant la phase lente. Pas plus que dans les deux cas précédents, les résultats obtenus sur deux groupes de 5 neurohypophyses en présence et en absence de tétródotoxine n'ont différencié significativement (test de Student: $p > 0,95$), (Fig. 9)

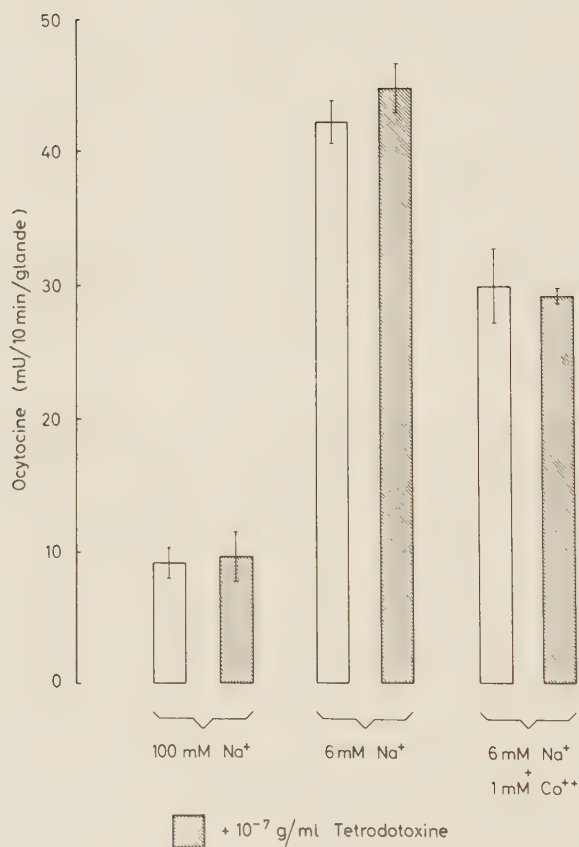


Figure 9. Absence d'effet de la tétrodotoxine sur la libération d'ocytocine produite par dépolarisation potassique.

Chaque colonne représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n = 4$) d'ocytocine libérée au cours d'une incubation de 10 minutes dans un milieu stimulant (56 mM de KCl) en absence (colonnes blanches) ou en présence (colonnes hachurées) de 10^{-7} g/ml de tétrodotoxine. Colonnes 1 et 2: Locke contenant 100 mM de Na; colonnes 3 et 4: substitution partielle au Na de choline; colonnes 5 et 6: comme 3 et 4, mais en présence de cobalt (1 mM).

Noter l'absence d'effet de la tétrodotoxine dans chacune de ces conditions expérimentales.

b) Manganèse, Cobalt

Certains ions divalents (Ba, Sr) peuvent, dans le processus de sécrétion des hormones neurohypophysaires, se substituer au calcium. Le magnésium par contre, non seulement ne le peut mais, de plus, inhibe la sécrétion provoquée en présence de Ca (DOUGLAS et POISNER, 1964a).

Nous avons étudié l'action sur la sécrétion d'ocytocine, stimulée par dépolarisation, du manganèse et du cobalt. Ces deux ions, qui abolissent les potentiels d'action calciques (FATT et GINSBORG, 1958; HAGIWARA et KIDOKORO, 1971; HAGIWARA et TAKAHASHI, 1967), bloquent sélectivement, selon BAKER (1972), la phase lente de l'influx calcique durant la dépolarisation de l'axone de calmar. Nous avons estimé la libération hormonale stimulée pendant une période de 10 minutes en présence de Mn ou de Co à des concentrations croissantes (Mn : 0,5 à 10 mM : Co : 0,5 à 5 mM).

Ces deux ions ont été ajoutés 20 minutes avant la période de stimulation, aux solutions de préincubation non stimulantes contenant 6 mM de Na et 2,2 mM de Ca. Les figures 10 et 11 représentent la relation existant entre la sécrétion d'ocytocine provoquée par dépolarisation potassique et respectivement la concentration externe de Mn ou de Co. La présence de l'un de ces deux ions dans le milieu d'incubation inhibe la sécrétion hormonale en réponse à une élévation standard de la concentration de KCl.

Selon les études de BAKER (1972) et de HAGIWARA et TAKAHASHI (1967) le Co devrait avoir un effet plus marqué que le Mn; toutefois nos résultats n'ont pas révélé une différence nette entre l'action ces deux ions. Le Mn paraît avoir une action inhibitrice plus marquée que le Co à des concentrations faibles (0,5 et 1,0 mM), alors qu'aux concentrations plus élevées. l'action inhibitrice du cobalt a été plus grande que celle du manganèse.

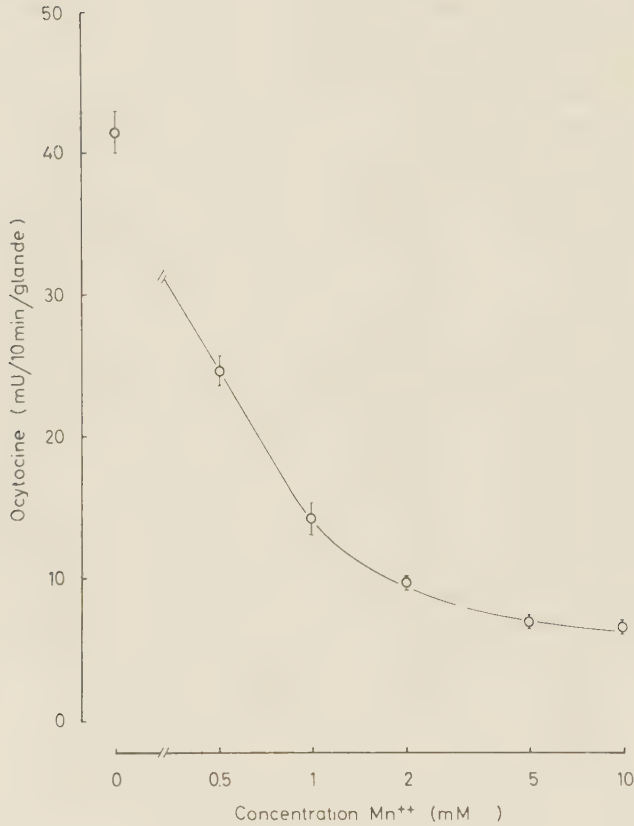


Figure 10. Sécration hormonale en présence de manganèse dans le milieu externe.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine libérée lors de la dépolarisation potassique en présence de manganèse dans le milieu d'incubation aux concentrations indiquées en abscisses (échelle logarithmique).

Lors des expériences sur l'influence de la présence dans le milieu externe de manganèse, de cobalt (Fig. 11) ou de D 600 (Fig. 12) nous avons effectué 20 essais-témoin afin de déterminer la valeur de la sécrétion hormonale produite par dépolarisation en absence de ces trois substances; la valeur moyenne (± 1 écart standard) de cette sécrétion est inscrite au zéro de l'échelle des abscisses sur les figures 10, 11 et 12.

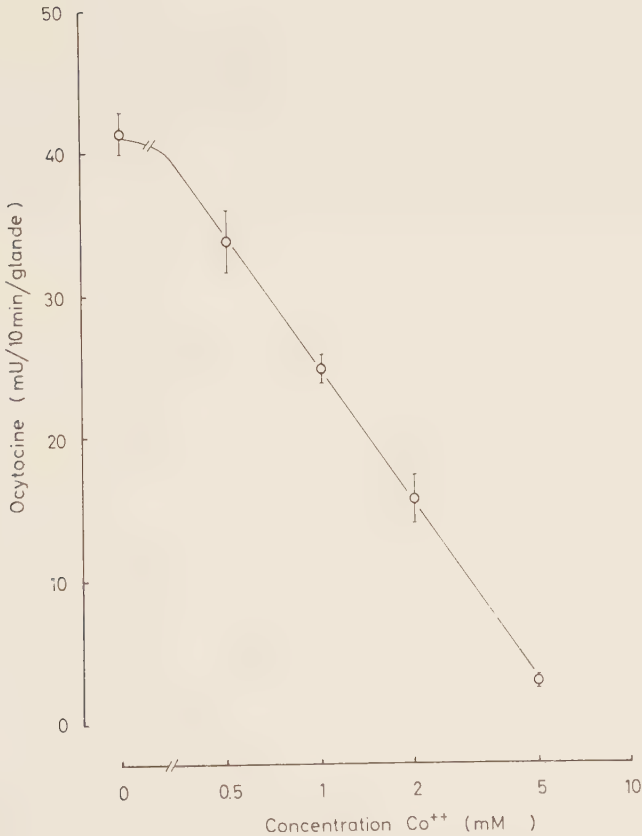


Figure 11. Sécrétion hormonale en présence de cobalt dans le milieu externe.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n=6$) d'ocytocine libérée lors de la dépolarisation potassique en présence de cobalt dans le milieu d'incubation aux concentrations indiquées en abscisses (échelle logarithmique).

Pour la valeur inscrite au zéro de l'axe des abscisses voir la légende de la figure 10.

c) D600

Nous avons également établi la variation de la sécrétion hormonale en fonction de concentrations croissantes du composé D600. Le D600 et l'iproveratril font partie d'une classe de substances utilisées en clinique, lors d'affections cardiaques, comme dilatateurs des artères coronaires.

Des études ont été entreprises dans le but de déterminer le mécanisme d'action de ces substances sur le muscle cardiaque (KOHLHARDT et coll., 1972) et sur l'axone géant de calmar (BAKER et coll., 1971). Il s'avère que ces substances bloquent, à faible concentration, la phase lente de l'influx calcique et, à forte concentration, également l'influx sodique. Nous avons testé l'effet du D600 sur la sécrétion d'ocytocine stimulée et sur la captation de ^{45}Ca (NORDMANN, 1973), à des concentrations comprises entre 10^{-6} et $5 \cdot 10^{-4}$ M, en utilisant une technique expérimentale semblable à celle employée pour le Mn et le Co. Les résultats (Fig. 12) ont indiqué un effet puissant du D600 sur la sécrétion hormonale puisqu'à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ M est apparu un effet inhibiteur significatif.

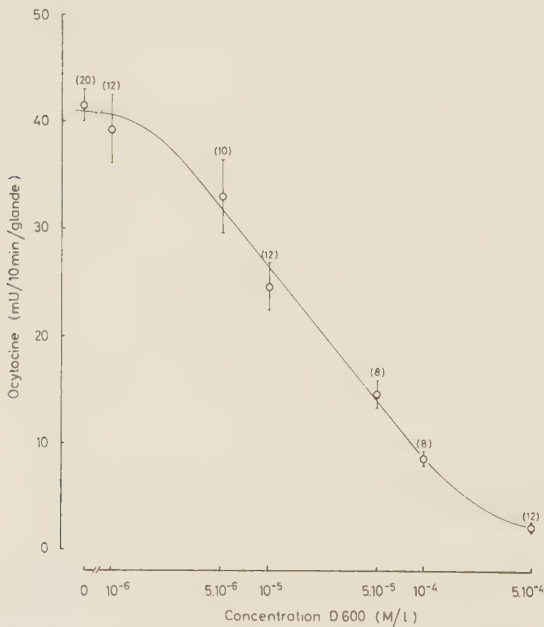


Figure 12. Sécrétion hormonale en présence de D600 dans le milieu externe.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard) (le nombre d'expériences est inscrit entre parenthèses au dessus de chacune des valeurs) d'ocytocine libérée lors de la dépolarisation potassique en présence de D600 dans le milieu d'incubation aux concentrations indiquées en abscisses (échelle logarithmique).

Pour la valeur inscrite au zéro de l'axe des abscisses voir la légende de la figure 10.

Dans ce chapitre où nous avons décrit l'action sur la sécrétion de l'ocytocine in vitro, d'agents dont la propriété commune est de diminuer la perméabilité au calcium des membranes excitables, deux points peuvent être relevés:

- lors de dépolarisations de longue durée, l'inhibition de la pénétration de calcium au travers des "canaux sodiques" n'a pas affecté la sécrétion hormonale. Il reste à savoir si, lors de dépolarisations de courte durée (comme c'est le cas in vivo), l'entrée de calcium au cours de cette phase, dite rapide, joue un rôle dans le processus de libération des hormones neurohypophysaires.

- l'adjonction au milieu externe de substances bloquant l'entrée de calcium durant la phase lente (Co, Mn et D600) a inhibé, de manière dépendant de la concentration, la sécrétion hormonale en réponse à des dépolarisations de longue durée, ce qui souligne l'importance, pour cette sécrétion de l'entrée de calcium durant la phase lente.

4) ACTION DU LANTHANE SUR LA SECRETION HORMONALE DE REPOS ET SUR LA SECRETION CAUSEE PAR DEPOLARISATION MEMBRANAIRE.

Le lanthane, cation aux dimensions atomiques proches de celles du calcium, mais trivalent, est connu pour diminuer dans plusieurs tissus excitables la perméabilité membranaire, notamment au calcium. En conséquence, en présence de La dans le milieu d'incubation, on s'attend à observer, comme avec les substances décrites dans les paragraphes précédents, une diminution de la libération des hormones neurohypophysaires en réponse à la dépolarisation membranaire. Mais le lanthane, de plus, augmente la sécrétion spontanée de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuro-musculaire (MILEDI, 1971). Nous avons entrepris d'étudier l'effet du lanthane sur la sécrétion d'ocytocine en milieu non dépolarisant, et nous avons examiné si l'augmentation de la sécrétion neurohormonale ainsi produite dépend de la concentration de Ca, de Na et de K du milieu d'incubation.

Comme l'effet du lanthane ne se développe que lentement, les neurohypophyses ont été incubées pendant 6 périodes successives de 20 minutes chacune et chaque incubat a été conservé pour le dosage de l'ocytocine libérée.

a) Effet sur la libération "spontanée"

Nous avons étudié l'effet de LaCl_3 à trois concentrations sur la libération d'ocytocine dans un milieu contenant 150 mM de NaCl, 5,6 mM de KCl, 2,2 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 10 mM de glucose et 2 mM de tampon TRIS. Après une période de 20 minutes d'incubation dans ce milieu, nous avons pour 3 groupes de 5 neurohypophyses isolées ajouté 0,5 1,0 ou 5,0 mM de LaCl_3 pendant les 5 périodes de 20 minutes suivantes.

Les résultats obtenus ont indiqué que le lanthane augmentait de manière marquée, mais non soutenue, la sécrétion d'ocytocine (fig. 13). Au niveau de la jonction neuro-musculaire où le LaCl_3 a un effet similaire (De BASSIO et coll., 1970) la présence de calcium dans le milieu d'incubation n'est pas nécessaire et la concentration externe de sodium exerce peu d'influence. Nous avons examiné l'influence de la composition ionique du milieu externe sur l'augmentation de sécrétion d'ocytocine causée par le lanthane.

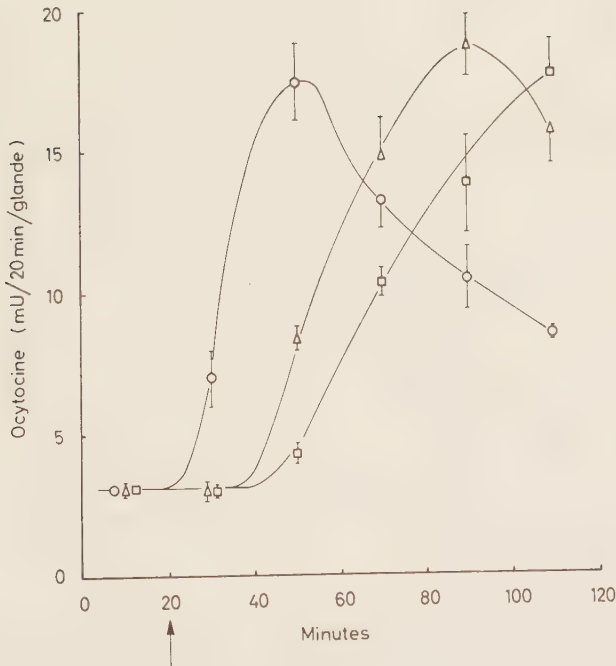


Figure 13. Effet du lanthane sur la sécrétion spontanée d'ocytocine.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard $n=5$) d'ocytocine libérée, par période de 20 min. d'incubation, dans un milieu non stimulant en présence de 0,5 (□), 1 (Δ) ou 5 (○) mM de lanthane ajouté à partir de la 20ème minute (↑).

b) Influence du calcium sur la sécrétion produite par le lanthane

Dans une expérience comparable à l'expérience précédente, mais en omettant le calcium du milieu d'incubation, les résultats obtenus (fig. 14) n'ont pas différé essentiellement de ceux obtenus en présence de calcium (Fig. 13). Sur les 16 comparaisons effectuées, seuls 5 résultats se sont révélés, selon le test de

Student, significativement différents; dans 2 cas, la sécrétion a été plus élevée en l'absence qu'en présence de calcium, alors que pour les trois autres, le contraire a été observé. Nous pensons pouvoir conclure que le lanthane stimule la sécrétion hormonale indépendamment de la concentration de calcium externe.

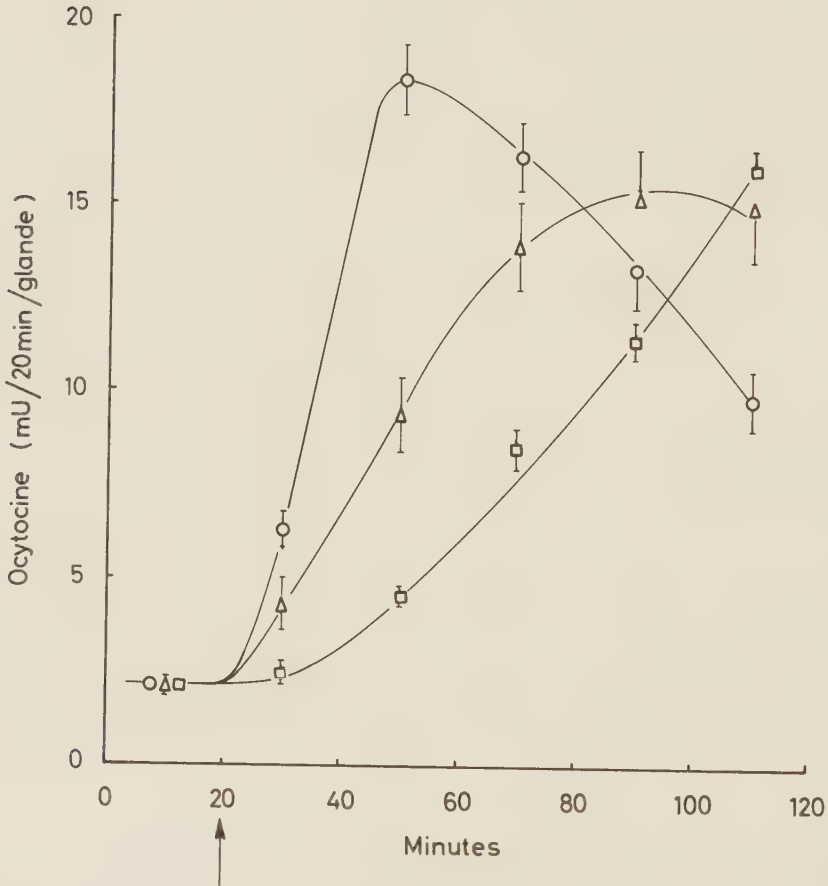


Figure 14. Libération hormonale produite par le lanthane en absence de calcium externe.

Les mêmes expériences que celles représentées sur la figure précédente ont été effectuées, mais en l'absence de calcium dans le milieu externe. La sécrétion moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine produite par l'adjonction de 0,5 (□), 1 (△) ou 5 (○) mM de lanthane après 20 min. de préincubation (↑), ne diffère pas significativement de celle obtenue en présence de 2,2 mM de calcium (Fig. 13).

c) Influence du sodium sur la sécrétion produite par le lanthane

L'effet d'un abaissement de la concentration externe de sodium de 150 à 6 mM sur la sécrétion hormonale causée par 5 mM de LaCl_3 a été étudié en suivant le même dessin expérimental. Deux groupes de 5 neurohypophyses ont été incubés en présence de 5 mM de lanthane, l'un dans un milieu contenant 150 mM de NaCl, l'autre dans un milieu contenant 6 mM de NaCl. Les résultats (fig. 15) ont montré que le sodium n'influénçait pas significativement la libération hormonale causée par le lanthane.

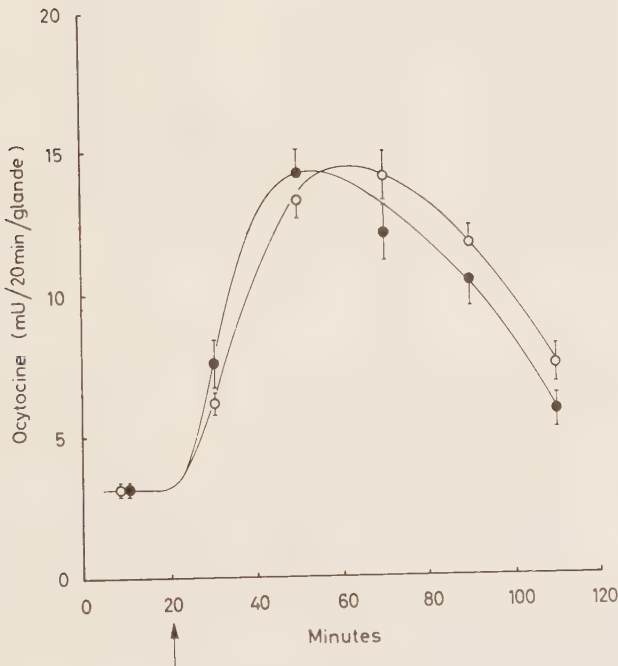


Figure 15. Absence d'effet du sodium sur la sécrétion hormonale produite par l'adjonction de lanthane au milieu d'incubation.

Chaque point représente la libération moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine produite par le lanthane (5 mM) ajouté après 20 min. ($\uparrow$) à un milieu non stimulant contenant 6 (●) ou 150 (○) mM de Na.

Noter l'absence d'effet du sodium sur la sécrétion causée par le lanthane.

d) Influence du lanthane sur la sécrétion produite par l'élévation de la concentration potassique.

Dans cette expérience, nous avons étudié l'action du lanthane à deux concentrations (0,5 et 5,0 mM) sur la sécrétion d'ocytocine causée par l'élévation de la concentration externe de KCl (56 mM). Dans un premier groupe de 5 neurohypophyses, 5 mM de lanthane ont été ajoutées simultanément à l'élévation de concentration de KCl, dans un deuxième groupe de 5 glandes, elles ont été ajoutées 20 minutes avant, dans un troisième groupe 40 minutes avant, dans un quatrième groupe 60 minutes avant, et dans un dernier groupe 80 minutes avant l'adjonction de KCl. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 16. Ils ont indiqué qu'à la concentration de 5 mM, le LaCl_3 bloquait immédiatement et complètement l'effet stimulant du potassium.

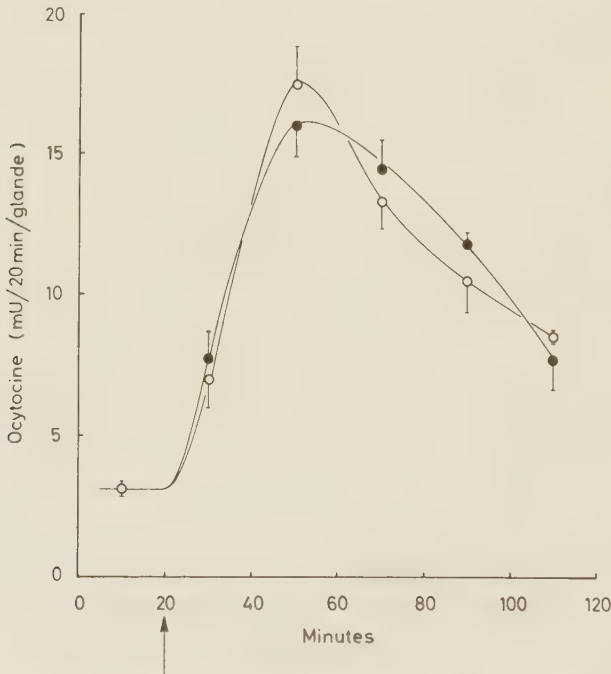


Figure 16. Effet de l'adjonction de 5 mM de lanthane sur la sécrétion produite par dépolarisation potassique.

Chaque point représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine libérée en 20 minutes dans un milieu contenant 5 mM de lanthane (ajouté après une préincubation de 20 minutes, au temps indiqué par la flèche) en présence de 5,6 (●) ou de 56 (○) mM de KCl.

Noter l'absence de différence significative entre les quantités d'ocytocine libérées en milieu stimulant et non stimulant.

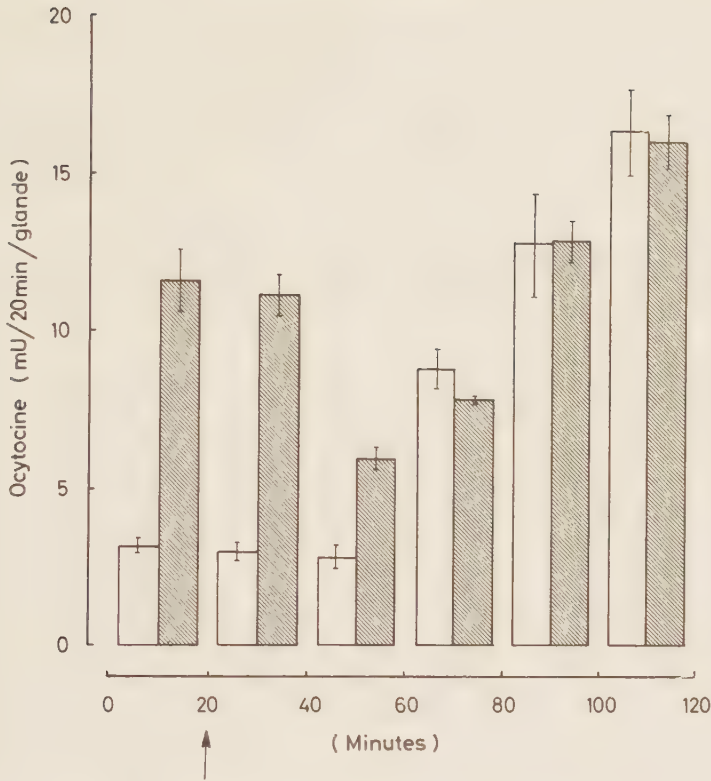


Figure 17. Effet de l'adjonction de 0,5 mM de lanthane sur la sécrétion causée par dépolarisation potassique.

Chaque colonne représente la quantité moyenne (± 1 écart standard, $n=5$) d'ocytocine libérée en 20 minutes d'incubation dans un milieu contenant 5,6 (colonnes blanches) ou 56 (colonnes hachurées) mM de KCl en présence de 0,5 mM de lanthane ajouté après une préincubation de 20 minutes. (↑)

Les deux premières colonnes représentent la libération de repos (colonne blanche) et la libération stimulée (colonne hachurée) en absence de lanthane. Noter que la sécrétion causée par la dépolarisation potassique n'est totalement bloquée par 0,5 mM de lanthane qu'après 40 minutes d'application de ce dernier.

Par contre, en présence de 0,5 mM de LaCl_3 , le blocage de l'effet stimulant de l'augmentation de la concentration de KCl n'a pas été immédiat.

En effet, lors de l'expérience témoin effectuée sur 5 neurohypophyses, la libération obtenue par dépolarisation potassique en absence de lanthane était de $11,6 \pm 1,0$ mU/20 min/glande; celle obtenue en présence de 0,5 mM/e de La ajouté au moment de l'élévation de la concentration potassique était de $11,2 \pm 0,7$ mU/20 min/glande. L'effet freinateur du La sur la sécrétion hormonale causée par

la dépolarisation potassique n'est apparu qu'après 20 minutes d'application; la libération provoquée par le potassium a été alors de $6,0 \pm 0,4$ mU/20 min/glande; et ne différait pas significativement de la libération de base.

Pour des durées d'application du lanthane plus longues, l'absence de différence significative entre la sécrétion provoquée par 0,5 mM de La en présence de 5,6 ou de 56 mM de KCl a indiqué l'abolition complète de l'effet stimulant du potassium.

En résumé, le lanthane a augmenté la sécrétion hormonale de manière indépendante de la composition ionique du milieu d'incubation; en particulier, la présence de Ca externe n'était pas indispensable.

e) Lanthane et sécrétion par exocytose

Dans la neurohypophyse, l'ocytocine et la vasopressine prêtes à être libérées sont emmagasinées dans des organites subcellulaires, les granules neurosécréteurs. De nombreuses données expérimentales récentes suggèrent que la sécrétion s'effectue par vidange du contenu de ces granules au cours d'un processus d'exocytose. Des images de microscopie électronique ont été publiées qui sont compatibles avec ce processus (NAGASAWA et coll., 1970; DOUGLAS et coll., 1971). Outre l'ocytocine ou la vasopressine, les granules neurosécréteurs renferment des protéines ayant une affinité pour ces deux hormones, les neurophysines. Si le processus de sécrétion implique l'extrusion de tout le contenu granulaire, les neurophysines devraient apparaître dans le milieu extracellulaire en même temps que les hormones et dans la même proportion que dans les granules intacts. La mise au point récente d'un dosage radioimmunologique spécifique pour les neurophysines (CHENG et FRIESEN, 1971) a permis de confirmer que des situations cliniques ou expérimentales qui se traduisent par une activité sécrétrice accrue s'accompagnent d'une augmentation de la concentration plasmatique de neurophysines (CHENG et FRIESEN, 1970; LEGROS et FRANCHIMONT, 1972). De plus, des expériences effectuées *in vitro* ont permis de confirmer que la libération d'ocytocine lors de stimulations était accompagnée d'une libération concomitante de neurophysines (NORDMANN et coll., 1971).

Comme les expériences décrites ci-dessus indiquent que le lanthane provoque un accroissement de la sécrétion neurohormonale qui est indépendant de la concentration externe de calcium, il convenait de se demander si la sécrétion est accompagnée d'une libération de neurophysines.

Après une préincubation de 20 minutes, 3 neurohypophyses ont été placées pendant une heure dans un milieu contenant 150 mM de sodium, 2,2 mM de CaCl_2 et 3 autres glandes dans le même milieu additionné de La à la concentration de 5 mM. Ces solutions ont été tamponnées par 2 mM de TRIS et équilibrées avec de l'oxygène pur. Les quantités d'ocytocine et de neurophysines apparaissant dans le milieu externe ont été dosées biologiquement (pour l'ocytocine) ou radioimmunologiquement (pour les neurophysines). Les moyennes de résultats obtenus avec 8 groupes de 3 neurohypophyses sont représentés dans le tableau V. Ils montrent que la libération d'ocytocine et de neurophysines a été accrue parallèlement (de 6,3 fois). Des résultats comparables ont été obtenus lors de la stimulation par dépolarisation potassique (tableau V). Il est conclu que l'action du lanthane et celle du potassium, bien qu'elles diffèrent de par leur dépendance vis-à-vis la composition ionique externe, aboutissent à la sécrétion hormonale par un processus similaire de vidange du contenu des granules neurosécréteurs.

TABEAU V: Effet du lanthane et du potassium sur la sécrétion d'ocytocine et de neurophysine.

<u>LANTHANE</u>			<u>POTASSIUM</u>		
Contrôle	Stimulation (5 mM La)	Rapport Stimul./Contr.	Contrôle	Stimulation (56 mM K)	Rapport Stimul./Contr.
OCYTOCINE (mU/h/mg)	5,1 32, 2	6, 3	5, 8	77, 3	13, 4
NEUROPHYSINE (ng/h/mg)	4, 8 30, 5	6, 3	3, 7	54, 8	14, 8

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Des progrès décisifs dans la connaissance des processus de neurosécrétion ont suivi l'application, à la jonction neuro-musculaire, des techniques de l'enregistrement intracellulaire. Une compréhension de plus en plus affinée des mécanismes liant la stimulation nerveuse et la sécrétion des médiateurs chimiques a ainsi été rendue possible. D'autre part la similitude de comportement entre les différents systèmes sécréteurs fait penser à un processus de couplage stimulation-sécrétion commun. Nous nous proposons de discuter nos résultats sur l'influence de la composition ionique externe sur la sécrétion d'ocytocine, à partir de neurohypophyses in vitro, en nous référant principalement aux connaissances acquises par l'étude de la sécrétion des médiateurs chimiques au niveau des terminaisons nerveuses.

I Sodium (lithium, choline)

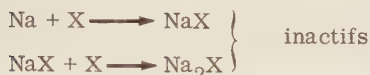
Le processus de libération des hormones neurohypophysaires in vivo suit l'envahissement des terminaisons axoniques de la neurohypophyse par des potentiels d'action de type sodique. La présence, dans le milieu extracellulaire, d'une concentration suffisante de sodium est donc essentielle pour la génération et la propagation de l'information régulant la sécrétion de l'ocytocine ou de la vasopressine.

Cependant le sodium n'est pas nécessaire dans le processus de libération lui-même, puisque, comme l'ont montré des expériences in vitro, la libération hormonale peut être déclenchée en absence de sodium externe (DOUGLAS et POISNER, 1964a) ou en présence de tétrodontoxine, qui bloque spécifiquement la conductance sodique (DREIFUSS et coll., 1971a).

Nos résultats montrent, en outre, qu'une diminution de la concentration du sodium externe, loin de réduire, potentialise la libération hormonale; en d'autres termes, le sodium externe possède une action freinatrice sur le processus de libération. Un même effet freinateur du sodium a également été observé sur le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque de grenouille (WILBRANDT et KOLLER, 1948; LUTTGAU et NIEDERGERKE, 1958). De même, la libération d'acétylcholine aux jonctions neuro-musculaires de batraciens est potentialisée lorsque la concentration externe de sodium est abaissée (KELLY, 1965; RAHAMIMOFF et COLOMO, 1967; COLOMO et RAHAMIMOFF, 1968; BIRKS et Coll., 1968). Cette effet du sodium peut s'expliquer par une compétition entre le sodium et le calcium.

GAGE et QUASTEL (1966) ont, pour la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses de la jonction neuro-musculaire, adopté l'hypothèse émise par DEL CASTILLO et KATZ (1954), selon laquelle la compétition entre le calcium et le sodium se fait au niveau de sites anioniques membranaires, appelés X. Leur occupation par un ion calcium formerait un complexe CaX actif et conduirait à la libération du médiateur. En concentration sodique suffisamment élevée, chacun de ces sites pourrait être occupé par un ou deux ions sodium

et former des complexes NaX ou Na_2X qui seraient inactifs. Cette compétition calcium-sodium peut être représentée par les équations suivantes :



Le nombre de sites X étant fini, la libération, qui est fonction du nombre de complexes CaX formés, est proportionnelle à la concentration de calcium et inversement proportionnelle au carré de la concentration de sodium.

Nos résultats sur la sécrétion d'ocytocine montrent qu'elle a été proportionnelle au rapport $(\text{Ca})_e/(\text{Na})_e^2$, mais dans un domaine de concentrations calciques restreint compris entre 0,22 et 4,4 mM. Pour des concentrations plus élevées (5,0 et 9,9 mM) les quantités d'ocytocines libérées ont été significativement inférieures à celles attendues. (DREIFUSS et coll., 1971b). Cette chute de la libération hormonale, observée en présence de concentrations calciques élevées, pourrait être produite par l'effet stabilisateur du calcium sur la perméabilité des membranes (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957).

L'antagonisme entre le sodium et le calcium peut se situer à plusieurs étapes du couplage stimulation-sécrétion :

- Il existe une interaction sodium-calcium au niveau des flux transmembranaires de calcium; le sodium externe diminue la captation de calcium durant la dépolarisation (NORDMANN, 1973).
- De plus, le sodium peut antagoniser le calcium au niveau des sites impliqués dans le processus de sécrétion, soit en les occupant de manière stable pour former des complexes inactifs, soit en diminuant leur affinité vis-à-vis du calcium.

Certaines expériences semblaient montrer que la formation des complexes CaX , impliqués dans le processus de sécrétion, se déroulait à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (MILEDI et SLATER, 1966; KUSANO, 1970), mais des expériences plus récentes suggèrent fortement un site d'action intracellulaire du calcium (MILEDI, 1973).

Dans la neurohypophyse, le lithium agit de manière similaire au sodium; cependant il possède une action freinatrice moindre que celle du sodium sur le processus de libération hormonale. Cette similitude d'action est probablement due aux propriétés physico-chimiques du lithium très voisines de celles du sodium.

De plus, au niveau des cellules nerveuses :

- le lithium peut remplacer le sodium pour la production et la propagation des potentiels d'action de l'axone géant de calmar (HODGKIN et KATZ, 1949) et des fibres C de mammifère (RITCHIE et STRAUB, 1957).
- le lithium possède le même coefficient de perméabilité à travers les membranes nerveuses que le sodium (ARMETT et RITCHIE, 1963).

- la tétrodotoxine bloque aussi bien les mouvements transmembranaires du lithium que du sodium (EVANS, 1969).

Cependant, il existe une différence, qui, pour des expériences de longue durée, peut avoir une influence importante: le lithium s'accumule dans les terminaisons nerveuses, la "pompe à sodium" semblant peu efficace pour son extrusion (KEYNES et SWAN, 1959).

La choline, quant à elle, de par sa dimension moléculaire élevée ne peut pénétrer dans les terminaisons axoniques et ne peut reproduire l'action du sodium.

II Strontium

En 1911 déjà, MINES avait montré que le strontium peut remplacer le calcium dans la transmission neuro-musculaire: cette observation a été récemment confirmée au moyen de techniques électrophysiologiques modernes (MILEDI, 1966; DODGE et coll., 1969; MEIRI et RAHAMIMOFF, 1971). DOUGLAS et RUBIN (1964), ont également mis en évidence la similitude d'action du strontium et du calcium dans le processus de libération des catécholamines de la médullo-surrénale.

Dans nos expériences, le strontium a été capable de se substituer au calcium dans le processus de sécrétion hormonale par la neurohypophyse. Lorsque la sécrétion stimulée par dépolarisation potassique a été abolie par l'omission du calcium dans le milieu d'incubation, le strontium peut la rétablir. La relation qui existe entre la concentration de strontium et la sécrétion d'ocytocine est similaire à celle qui relie la sécrétion de vasopressine à la concentration de calcium externe (DOUGLAS et POISNER, 1964a). L'action du strontium a cependant été moins efficace que celle du calcium. La moindre efficacité du strontium pourrait être due, soit à une affinité du strontium plus faible que celle du calcium pour les sites X impliqués dans le processus de sécrétion, soit au fait que les complexes SrX formés seraient en eux-mêmes moins efficaces que les complexes CaX .

L'action inhibitrice du Mg et du Na sur la libération en présence de strontium a été similaire à celle observée dans les études sur l'antagonisme calcium-magnésium (DOUGLAS et POISNER, 1964a; MIKITTEN et DOUGLAS, 1965; ISHIDA, 1968) et sur l'antagonisme calcium-sodium (Chap. 3, 1).

Au niveau de la jonction neuro-musculaire, l'action du strontium sur la libération d'acétylcholine dépend de la concentration calcique du milieu d'incubation (MEIRI et RAHAMIMOFF, 1971): à basse concentration de Ca externe, l'adjonction de strontium active la libération du médiateur, alors qu'à 1,8 mM de Ca, l'adjonction de strontium au milieu la diminue. Nos expériences ont montrés également que l'adjonction de strontium dans un milieu pauvre en Ca (0,5 mM) tend à augmenter la sécrétion hormonale, alors que dans un milieu contenant 4 mM de Ca, la présence de strontium la diminue.

MEIRI et RAHAMIMOFF (1971) ont attribué la réduction de la libération d'acétylcholine par le strontium, en présence de calcium, à concentration élevée au fait que le strontium pourrait avoir une affinité comparable à celle du calcium pour l'occupation des sites X activateurs de la sécrétion; le strontium rem-

placerait le calcium sur un certain nombre de sites pour former des complexes SrX moins actifs que les complexes CaX . Il convient cependant de rappeler qu'à des concentrations de Ca supérieures à 4,4 mM (DOUGLAS et POISNER, 1964a) ainsi qu'à des concentrations de strontium supérieures à 8 mM, (Chap. 3, 2, b), la sécrétion hormonale tend à s'abaisser. Cette observation suggère une explication alternative à la réduction de la sécrétion hormonale observée en présence de 4 mM de Ca et de 4 mM de Sr , à savoir que les quantités d'hormones sécrétées en réponse à la dépolarisation pourraient dépendre de la concentration totale du milieu d'incubation en cations divalents: à partir d'une valeur critique l'excitabilité et la perméabilité membranaires diminuent (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957).

En résumé, le strontium possède, dans les mécanismes de sécrétion des hormones neurohypophysaires, des propriétés qualitativement similaires à celles du calcium (BUCHS et coll., 1972).

III Bloqueurs de la perméabilité calcique (Tétrodotoxine, Manganèse, Cobalt, D600).

Plusieurs auteurs ont montré que la sécrétion hormonale s'accompagne d'un gain de calcium par les neurohypophyses stimulées (DOUGLAS et POISNER, 1964b; NORDMANN, 1973). Ces expériences suggèrent que, dans les terminaisons neurosécrétrices dépolarisées, du calcium diffuse du milieu externe dans les cellules et que l'élévation de la concentration de Ca cytoplasmique qui en résulte déclenche la libération hormonale. Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode qui permette de déterminer la concentration cytoplasmique de Ca dans des axones d'environ 1μ de diamètre. Sur la base de résultats obtenus sur de cellules musculaires ou nerveuses plus volumineuses, on estime généralement que la concentration interne de calcium ionisé y est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-7} M. Nous la considérons à priori comme étant du même ordre de grandeur dans la neurohypophyse. En présence d'une concentration de Ca externe d'environ 10^{-3} M, il doit exister un puissant gradient qui tend à faire pénétrer du calcium dans les cellules. Le flux transmembranaire de calcium (I_{Ca}) dépend de la perméabilité membranaire au calcium (g_{Ca}) et de la force électromotrice ($V-E_{Ca}$) selon la formule

$$\begin{aligned} I_{Ca} &= g_{Ca} (V - E_{Ca}) \\ \text{où } V &= \text{potentiel de membrane} \\ E_{Ca} &= \text{potentiel d'équilibre du calcium} \end{aligned}$$

V a pu être modifié expérimentalement et d'une manière finement contrôlée dans la synapse géante du ganglion stellaire du calmar. KATZ et MILEDI (1967) ont montré qu'une sécrétion du médiateur ne s'y observe en réponse à la dépolarisation de la terminaison présynaptique que si $V < E_{Ca}$; et du calcium injecté directement dans la terminaison présynaptique cause aussi la libération du médiateur (MILEDI, 1973). Ces résultats indiquent clairement que le Ca agit intracellulairement pour promouvoir la sécrétion dans cette préparation.

Dans nos expériences, l'augmentation de la concentration externe de potassium a probablement pour effet d'augmenter la perméabilité calcique de la membrane (g_{Ca}) qui, comme la perméabilité sodique (g_{Na}), dépend du potentiel de membrane. La perméabilité calcique de la membrane (g_{Ca}) peut être modifiée par différents cations ou substances: tétródotoxine, cobalt, manganèse, lanthane ou D600 (BAKER, 1972).

- Tétródotoxine. Sur la neurohypophyse isolée, l'effet de la tétródotoxine reste controversé. ISHIDA (1967) a décrit en présence de cette substance une diminution réversible de la sécrétion d'ocytocine en réponse à une dépolarisation standard, diminution qui était d'autant plus marquée que la concentration sodique du milieu d'incubation était plus basse. Les études de ISHIDA indiquent également que la tétródotoxine réduit l'augmentation de l'efflux de ^{45}Ca à partir de neurohypophyses dépolarisées. DREIFUSS et coll., (1971a), ont montré qu'alors même que la tétródotoxine abolit la sécrétion hormonale en réponse à la stimulation électrique de la tige pituitaire, elle n'affecte que peu la sécrétion provoquée par la dépolarisation des membranes par élévation de la concentration externe de potassium. ISHIDA a interprété ses résultats en postulant que la tétródotoxine pouvait non seulement bloquer les mouvements sodiques mais aussi affecter les flux calciques membranaires. Tel semble bien être le cas d'après les travaux de BAKER et coll. (1971), qui ont montré que l'entrée de calcium, au moment de la dépolarisation de la membrane de l'axone géant de calmar, pouvait être divisée en deux composantes: une phase rapide, bloquée par la tétródotoxine et qui représente l'entrée de calcium à travers le canal sodique, et une phase lente, bloquée par le Co, Mn, Mg, La et le D600, mais non affectée par la tétródotoxine. L'absence d'effet de la tétródotoxine sur la libération d'ocytocine, mise en évidence dans nos expériences, trouve un parallèle dans les expériences de NORDMANN (1973), qui a montré que la captation de ^{45}Ca par la neurohypophyse isolée, sous stimulation potassique, n'était pas modifiée par l'adjonction de 10^{-7} g/ml de tétródotoxine. Sous la réserve que la neurohypophyse ne possède un seuil de sensibilité à la tétródotoxine plus élevé que les autres tissus excita- bles, où des concentrations de 10^{-8} à 10^{-7} g/ml bloquent entièrement la conduc- tance sodique, nos résultats suggèrent que l'entrée de calcium à travers le canal sodique ne contribue pas significativement à la réponse hormonale consécutive à une dépolarisation potassique de longue durée. De plus, la tétródotoxine n'affecte ni la sécrétion d'acétylcholine provoquée par une dépolarisation directe des terminaisons nerveuses motrices de la jonction neuro-musculaire (ELM- QVIST et FELDMANN, 1965; KATZ et MILEDI, 1967), ni la libération de nora- drénaline de synaptosomes isolés du système nerveux central de rat (BLAU- STEIN et coll., 1972).

Nos résultats n'excluent pas la possibilité que, *in vivo*, où la sécrétion hormo- nale est consécutive à l'invasion des terminaisons neurosécrétrices par des trains de potentiels d'action, qui provoquent des dépolarisations de courte du- rée, la part de la phase rapide de l'influx calcique soit une fraction plus consi- dérable de l'influx calcique total et puisse contribuer de manière non négligea- ble à la sécrétion.

- Cobalt, manganèse et D600. Comme le montrent nos résultats, la sécrétion est fortement réduite en présence de magnésium et d'autres cations ou substances, tels le Co, le Mn et le D600 (DREIFUSS, GRAU et NORDMANN, 1973). Dans le muscle cardiaque, le potentiel d'action a une forte composante calcique; le Co, le Mn et le D600 en diminuent la durée (KOLHARDT et coll., 1972; REUTER, 1973); ces substances réduisent aussi la sécrétion d'acétylcholine au niveau de la jonction neuro-musculaire (DEL CASTILLO et KATZ, 1954; MEIRI et RAHAMIMOFF, 1972). Ces observations suggèrent fortement que dans ces divers tissus, le calcium entre dans les cellules par une voie ad hoc pour promouvoir la sécrétion ou déclencher la contraction musculaire. Il pourrait être argué qu'une réduction du flux transmembranaire de Ca dans ces expériences ne résulte pas d'une action spécifique du Mg, du Mn ou du Co sur la perméabilité calcique de la membrane, mais est une conséquence de l'action "stabilisatrice de membrane" de concentrations millimolaires de cations divalents. Une action sur les canaux de perméabilité calcique en l'absence d'une diminution non spécifique de l'excitabilité membranaire paraît établie pour le D600 qui agit à des concentrations beaucoup plus faibles, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

IV Lanthane

Le lanthane, qui diminue la perméabilité générale de la membrane, inhibe la sécrétion d'ocytocine en réponse à la dépolarisation potassique mais, par contre, augmente de manière significative la libération "spontanée" d'ocytocine in vitro. Cette augmentation de la sécrétion "spontanée" est indépendante de la composition ionique du milieu d'incubation (Na, Ca ou K). L'abolition de l'accroissement de la sécrétion hormonale lors de la dépolarisation potassique peut s'expliquer par les effets du lanthane sur les membranes excitables; le La les stabilise et réduit leur perméabilité ionique. Comme le Mn, le Co et le D600, le lanthane réduit les mouvements de calcium transmembranaires (HAGIWARA et TAKAHASHI, 1967; WEISS et GOODMAN, 1969) y compris dans la neurohypophyse isolée (NORDMANN, 1973). Le mécanisme de l'augmentation par le lanthane de la sécrétion "spontanée" des hormones neurohypophysaires n'est pas connu. Il se pourrait que le lanthane se fixe à des sites anioniques membranaires (LASZLO et coll., 1952) et ce faisant, soit modifie les propriétés physico-chimiques des membranes, soit mobilise du calcium intramembranaire qui diffuserait vers l'intérieur et pourrait activer le processus de sécrétion. Il n'est cependant pas exclu qu'une fraction du lanthane pénètre dans l'espace intracellulaire; dans ce cas il pourrait ou bien y diminuer la séquestration du Ca par les mitochondries (MELA, 1969) et augmenter la concentration cytoplasmique de calcium ionisé ou bien agir intracellulairement comme analogue du calcium. L'augmentation de la sécrétion "spontanée" hormonale par le lanthane n'a pas été soutenue; une élévation de la concentration de lanthane n'a pas accru significativement la quantité totale d'ocytocine libérée mais a affecté essentiellement le déroulement temporel de la sécrétion. Dans ce contexte, il convient de mentionner des études faites à l'aide du microscope électronique sur la jonction neuro-musculaire de batracien (HEUSER et MILEDI, 1971): l'application de lanthane y conduit à une déplétion importante du nombre de vésicules synaptiques des terminaisons nerveuses. Il semble exister dans ces terminaisons un dépôt de produit de sécrétion mobilisable par le lanthane qui ne représente qu'une fraction du contenu total en sécrétat.

L'augmentation de la sécrétion d'ocytocine, produite par l'adjonction de lanthane au milieu d'incubation, s'accompagne d'une libération concomitante de neurophysine. Ce résultat suggère que le lanthane provoque la vidange, par exocytose, des granules neurosécréteurs.

En conclusion, les effets des modifications de la composition ionique de la solution externe étudiés dans ce travail, soulignent le rôle-clé que joue le calcium dans le couplage dépolarisation-sécrétion dans la neurohypophyse, comme dans de nombreux autres tissus.

RESUME

1) La libération d'ocytocine à partir de neurohypophyses isolées in vitro, en réponse à une dépolarisation potassique standard, est proportionnelle au rapport $Ca_{ext.} / Na_{ext.}^2$; elle demeure constante pour autant que ce rapport soit maintenu constant.

2) Le lithium agit de manière similaire au sodium; cependant il possède une action freinatrice moindre que celle du sodium sur le processus de libération hormonale. La choline, quant à elle, n'exerce pas d'action type sodium sur le processus de sécrétion des hormones neurohypophysaires.

3) Le strontium est un cation divalent capable de se substituer au calcium dans le processus de sécrétion hormonal: lorsque la sécrétion stimulée par la dépolarisation potassique a été abolie par l'omission du calcium dans le milieu d'incubation, le strontium peut la rétablir; l'action sécrétagogue du strontium est inhibée par le sodium et le magnésium, comme l'est celle du calcium. De plus, la relation entre la quantité d'hormone libérée et la concentration externe de strontium est analogue à celle existant entre la libération hormonale et la concentration externe de calcium.

L'action du strontium est cependant moins efficace que celle du calcium.

4) La tétrodontoxine, qui bloque la phase rapide de l'entrée de calcium durant la dépolarisation, ne modifie pas la sécrétion hormonale en réponse à une dépolarisation de longue durée.

5) Le cobalt, le manganèse ou le D600, substances qui toutes inhibent l'entrée de calcium dans les cellules durant la phase lente, réduisent la sécrétion provoquée d'hormone.

6) Le lanthane, qui diminue la perméabilité générale de la membrane, inhibe la sécrétion d'ocytocine en réponse à la dépolarisation potassique mais, par contre, augmente de manière significative la libération "spontanée" d'ocytocine *in vitro*. Cette augmentation de la sécrétion "spontanée" est indépendante de la composition ionique du milieu d'incubation (Na, Ca ou K).

7) L'augmentation de la sécrétion spontanée d'ocytocine produite par l'adjonction de lanthane au milieu d'incubation s'accompagne d'une libération concomitante de neurophysine, ce qui suggère que le lanthane déclenche également le processus de libération par exocytose.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMETT C.J. et RITCHIE J.M. (1963). On the permeability of mammalian non-myelinated fibres to sodium and to lithium ions. J. Physiol., Lond. 165 : 130-140.
- BAKER P. F., MEVES H. et RIDGWAY E.B. (1971). Phasic entry of calcium in response to depolarization of giant axons of Loligo Forbesi. J. Physiol., Lond. 216 : 70P-71P.
- BAKER P. F. (1972). Transport and metabolism of calcium ion in nerve. Prog. Biophys. molec. Biol. 24: 177-224.
- BARGMANN W. (1949). Ueber die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 34: 610-634.
- BARGMANN W. et SCHARRE E. (1951). The site of origin of hormones of the posterior pituitary. Am. Scient. 39: 255-259.
- BIRKS R.I., BURSTYN P.G.R. et FIRTH D.R. (1968). The form of sodium-calcium competition at the frog myoneural junction. J. gen. Physiol. 52: 887-908.
- BISSET G.W., CLARK B.J., HALDAR J., HARRIS M.C., LEWIS G.P. et ROCHA E SILVA M. (1967). The assay of milk-ejecting activity in the lactating rat. Br. J. Pharmac. 31: 537-549.
- BLAUSTEIN M. P., JOHNSON E.M. Jr et NEEDLEMAN P. (1972) Calcium-dependent norepinephrine release from presynaptic nerve endings in vitro. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2237-2240.
- BROOKS C. McC., ISHIKAWA T., KOIZUMI K. et LU H.H. (1966). Activity of neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and its control. J. Physiol., Lond. 182: 217-231.
- BUCHS M., DREIFUSS J.J., GRAU J.D. et NORDMANN J.J. (1972). Strontium as a substitute for calcium in the process leading to neurohypophysial hormone secretion. J. Physiol., Lond. 222: 168P-169P.
- CAPRA J.D., KEHOE J.M., KOTELCHUCK D., WALTER R. et BRESLOW E. (1972). Evolution of neurophysin proteins: the partial sequence of bovine neurophysin I. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 431-434.
- CHENG K.W. et FRIESEN H. (1970). Physiological factors regulating secretion of neurophysin. Metabolism 19: 876-890.

- CHENG K.W. et FRIESEN H. (1971). A radioimmunoassay for vasopressin binding proteins - neurophysin.
Endocrinology 88: 608-619.
- COLOMO F. et RAHAMIMOFF R. (1968). Interaction between sodium and calcium ions in the process of transmitter release at the neuromuscular junction.
J. Physiol., Lond. 198: 203-218.
- CROSS B.A. et VAN DYKE H.B. (1953). The effect of highly purified posterior pituitary principles on the lactating mammary gland of the rabbit.
J. Endocr. 9: 232-235.
- CROSS B.A. (1961). Neural control of oxytocin secretion.
In "Oxytocin", R. Caldeyro et H. Heller, éd. London Pergamon, pp 24-46.
- DEAN C.R. et HOPE D.B. (1968). The isolation of neurophysin I and II from bovine pituitary neurosecretory granules separated on a large scale from other subcellular organelles.
Biochem. J. 106: 565-573.
- DE BASSIO W.A., SCHNITZLER R.M. et PARSONS R.L. (1971). Influence of lanthanum on transmitter release at the neuromuscular junction.
J. Neurobiol. 2: 263-278.
- DEL CASTILLO J. et KATZ B. (1954). The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings.
J. Physiol., Lond. 124: 553-559.
- DODGE F.A. MILEDI R. et RAHAMIMOFF R. (1969). Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction.
J. Physiol., Lond. 200: 267-283.
- DOUGLAS W.W. et POISNER A.M. (1964a). Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from neurohypophysis.
J. Physiol., Lond. 172: 1-18.
- DOUGLAS W.W. et POISNER A.M. (1964b). Calcium movement in the neurohypophysis of the rat and its relation to the release of vasopressin.
J. Physiol., Lond. 172: 19-30.
- DOUGLAS W.W. et RUBIN R.P. (1964). The effects of alkaline earths and other divalent cations on adrenal medullary secretion.
J. Physiol., Lond. 175: 231-241.
- DOUGLAS W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells.
Br. J. Pharmac. 34: 451-471.
- DOUGLAS W.W., NAGASAWA J. et SCHULZ R.A. (1971). Coated microvesicles in neurosecretory terminals of posterior pituitary glands shed their coats to become smooth "synaptic vesicles".
Nature 232: 340-341.

- DREIFUSS J.J. , KALNINS I. , KELLY J.S. et RUF K.B. (1971a).
Action potentials and release of neurohypophysial hormones in vitro.
J. Physiol., Lond. 215 : 805-817.
- DREIFUSS J.J. , GRAU J.D. et BIANCHI R. E. (1971 b.) Antagonism between
Ca and Na ions at neurohypophysial nerve terminals.
Experientia 27: 1295-1296.
- DREIFUSS J.J. , GRAU J.D. et NORDMANN J.J. (1973). Effects on the isolated
neurohypophysis of agents which affect the membrane permeability to calcium.
J. Physiol., Lond. 231: 96-98P
- DU VIGNEAUD V. (1954). Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin
and vasopressin.
Harvey Lect. 50: 1-26.
- DYBALL R. E. J. (1971). Oxytocin and ADH secretion in relation to electrical
activity in antidromically identified supraoptic and paraventricular units.
J. Physiol., Lond. 214: 245-256.
- ELMQVIST D. et FELDMAN D. (1965). Spontaneous activity at mammalian
neuromuscular junction in tetrodotoxin.
Acta Physiol. scand. 64: 475-477.
- EVANS M. H. (1969). The effect of saxitoxin and tetrodotoxin on the nerve con-
duction in the presence of lithium ions and of magnesium ions.
Br. J. Pharmac. 36: 418-425.
- FATT P. et GINSBORG B. L. (1958). The ionic requirement for the production
of action potentials in the crustacean muscle fibres.
J. Physiol., Lond. 142: 516-543.
- FRANKENHAEUSER B. et HODGKIN A. L. (1957). The action of calcium on the
electrical properties of squid axons.
J. Physiol., Lond. 137: 218-244.
- GAGE P. W. et QUASTEL D. M. J. (1966). Competition between sodium and
calcium ions in transmitter release at mammalian neuromuscular junctions.
J. Physiol., Lond. 185: 95-123.
- GINSBURG M. et IRELAND M. (1966). The role of neurophysin in the transport
and release of neurohypophysial hormones.
J. Endocr. 35: 289-298.
- GRAU J.D. (1972). Expériences sur la sécrétion d'ocytocine à partir de neuro-
hypophyses isolées
Travail de diplôme
- HAGIWARA S. et TAKAHASHI K. (1967). Surface density of calcium ions and
calcium spikes in the barnacle muscle fibre membrane.
J. gen. Physiol. 50: 583-601
- HAGIWARA S. et KIDOKORO Y. (1971). Na and Ca components of action poten-
tial in amphioxus muscle cells.
J. Physiol., Lond. 219: 217-232.

- HELLER H. et GINSBURG M. (1966). Secretion, metabolism and fate of the posterior pituitary hormones.
In: The pituitary gland, 3 G.W. Harris et B.T. Donovan, éd.
- HEUSER J. et MILEDI R. (1971). Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions.
Proc. Roy. Soc. B. 179: 247-260.
- HODGKIN A.L. et KATZ P. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J. Physiol., Lond. 108: 37-77.
- ISHIDA A. (1967). The effect of tetrodotoxin on calcium dependent link in stimulus-secretion coupling in neurohypophysis.
Jap. J. Physiol. 17: 308-320.
- ISHIDA A. (1968). Stimulus-secretion coupling on the oxytocin release from the isolated posterior pituitary lobe.
Jap. J. Physiol. 18: 471-480.
- KAO C.Y. (1966). Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena.
Pharmac. Rev. 18: 997-1049.
- KATZ B. et MILEDI R. (1967). Tetrodotoxin and neuromuscular transmission.
Proc. Roy. Soc. B. 167: 8-22.
- KELLY J.S. (1965). Antagonism between Na and Ca at the neuromuscular junction.
Nature 205: 296-297
- KELLY J.S. (1968). The antagonism of Ca by Na and other monovalent ions at the frog neuromuscular junction.
Q. Jl exp. Physiol. 53: 239-249.
- KEYNES R.D. et SWAN R.C. (1959). The effect of external sodium concentration on the sodium fluxes in frog skeletal muscle.
J. Physiol., Lond. 188: 235-260.
- KOHLHARDT M., BAUER B., KRAUSE H. et FLECKENSTEIN A. (1972). Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.
Pflügers Arch. gen. Physiol. 335: 309-322.
- KUSANO K. (1970). Influence of ionic environment on the relationship between pre- and postsynaptic potentials.
J. Neurobiol. 1: 435-457.
- LASZLO D., EKSTEIN D.M., LEWIN R. et STERN K.G. (1952). Biological studies on stable and radioactive rare earth compounds: I on the distribution of lanthanum in the mammalian organism.
J. nat. Cancer Inst. 13: 559-571.

- LEGROS J.J., FRANCHIMONT P. et HENDRICK J.C. (1969). Dosage radio-immunologique de la neurophysine dans le sérum des femmes normales et des femmes enceintes.
C.R. Soc. Biol., Paris 163: 2773-2777.
- LEGROS J.J. et FRANCHIMONT P. (1972). Human neurophysin blood levels under normal, experimental and pathological conditions.
Clin. Endocr. 1: 99-113.
- LOCKE F.S. (1894). Notiz über den Einfluss physiologischer Kochsalzlösung auf die elektrische Erregbarkeit von Muskel und Nerv.
Centr. f. Fysiol. 8: 166-167.
- LUTTGAW H.C. et NIEDERGERKE R. (1958). The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart.
J. Physiol., Lond. 143: 486-505.
- MEIRI U. et RAHAMIMOFF R. (1971). Activation of transmitter release by strontium and calcium ions at the neuromuscular junction.
J. Physiol., Lond. 215: 709-726.
- MEIRI U. et RAHAMIMOFF R. (1972). Neuromuscular transmission inhibited by manganese ions
Science 176: 308-309.
- MELA L. (1969). Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetic drugs.
Biochemist. 8: 2481-2486.
- MLEDI R. (1966). Strontium as a substitute for calcium in the process of transmitter release at the neuromuscular junction.
Nature 212: 1233-1234.
- MLEDI R. et SLATER C.R. (1966). The action of calcium on neuronal synapse in the squid.
J. Physiol., Lond. 184: 473-498.
- MLEDI R. (1971). Lanthanum abolishes the calcium response of nerve terminals.
Nature 229: 410-411.
- MLEDI R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals.
Proc. R. Soc. B. 183: 421-425.
- MIKITEN T.M. et DOUGLAS W.W. (1965). Effect of calcium and other ions on vasopressin release from rat neurohypophysis stimulated electrically in vitro.
Nature 207: 302-303.
- MINES G.R. (1911). On the remplacement of calcium in certain neuromuscular mechanisms by allied substances.
J. Physiol., Lond. 42: 251-266.

- NAGASAWA J. , DOUGLAS W.W. et SCHULZ R.A. (1970) Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of "synaptic vesicle" formation in posterior pituitary glands.
Nature 227: 407-409.
- NARAHASHI T. , MOORE J.W. et SCOTT W.R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons.
J. gen. Physiol. 47: 965-974.
- NIEDERGERKE R. (1963). Movement of calcium in frog ventricles at rest and during contractures.
J. Physiol., Lond. 167: 515-550.
- NORDMANN J.J. , DREIFUSS J.J. et LEGROS J.J. (1971). A correlation of release of polypeptide hormones and immunoreactive neurophysin from isolated rat neurohypophysis.
Experientia 27: 1344-1345.
- NORDMANN J.J. (1973). Mouvements de calcium dans la neurohypophyse en rapport avec la sécrétion hormonale.
Thèse. Faculté des Sciences, Université de Genève.
- RAHAMIMOFF R. et COLOMO F. (1967). Inhibitory action of sodium ions on transmitter release at the motor end-plate.
Nature 215: 1174-1176.
- REUTER H. et SEITZ N. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol., Lond. 195: 451-470.
- REUTER H. (1973). Divalent cations as charge carriers in excitable membrane.
Progr. Biophys. molec. Biol., 26: 3-43.
- RITCHIE J.M. et STRAUB R.W. (1957). The hyperpolarization which follows activity in mammalian non-medullated fibres.
J. Physiol., Lond. 136: 80-97.
- SANDOW A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response.
Yale J. Biol. Med. 25: 176-201.
- SAWYER W.H. (1961). Neurohypophysial hormones.
Pharmac. Rev. 13: 225-277.
- VERNEY E.B. (1947). The antidiuretic hormone and the factors which determine its release.
Proc. Roy Soc. B. 135: 25-106.
- WEISS G.B. et GOODMAN F.R. (1969). Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and Ca 45 movements in intestinal smooth muscle.
J. Pharmac. Exp. Ther. 169: 46-55.

- WILBRANDT W. et KOLLER H. (1948). Die Calcium-Wirkung am Froschherzen als Funktion des Ionengleichgewichts zwischen Zellmembran und Umgebung. Hel. physiol. pharmac. Acta 6: 208-221.
- WUU T.C., CRUMM S. et SAFFRAN M. (1971). Amino acid sequence of porcine neurophysin-I. J. biol Chem. 246: 6043-6063

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont par leurs conseils et leur travail contribué à la réalisation de cette thèse, notamment MM. J. Posternak, J.J. Dreifuss, J.J. Nordmann, J.J. Legros (Liège) et E.K. Matthews (Cambridge), ainsi que tous les membres du département de physiologie de l'université.

